

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE
Faculté de génie
Département de génie chimique et de génie biotechnologique

DÉVELOPPEMENT DE FILMS DE
POLYCAPROLACTONE BIOMIMÉTIQUES
FAVORISANT LA DIFFÉRENCIATION
OSTÉOBLASTIQUE DE CELLULES SOUCHES

Mémoire de maîtrise
Spécialité : génie chimique

Jessica JANN

Jury : Professeure Nathalie FAUCHEUX (directrice)
Professeur Bernard MARCOS (rapporteur)
Professeur Gervais SOUCY
Professeur Denis GROLEAU

Que la Force soit avec toi.
(Star Wars)

RÉSUMÉ

Le développement d'un biomatériau contrôlant précisément le comportement de cellules souches serait un avantage considérable pour des applications de médecine régénératrice et d'ingénierie tissulaire. Actuellement, le vieillissement de la population mondiale est associé à de nombreux problèmes de dégénérescence des tissus, en particulier dans le contexte osseux. Le coût annuel des opérations chirurgicales orthopédiques pratiquées aux États-Unis s'élève à 8.2 milliards de dollars US. Afin de trouver des alternatives aux greffes traditionnelles, des biomatériaux mimant la physiologie osseuse ont été conçus. Une des stratégies consiste à préparer des matériaux biomimétiques en fonctionnalisant, par exemple, la surface des matériaux par des peptides dérivés des protéines d'adhésion de la matrice extracellulaire (ECM) tel que la fibronectine pour favoriser l'ancrage des cellules osseuses. D'autres molécules comme les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) jouent un rôle essentiel dans le processus physiologique de la réparation osseuse. Ces BMPs peuvent être combinées aux biomatériaux afin d'orienter la réponse des cellules osseuses et ainsi améliorer la régénération des tissus. L'utilisation de peptides dérivés des BMPs, 300 fois moins dispendieux, ajoute un avantage considérable dans le développement des matériaux biomimétiques. En outre, des relations croisées entre les récepteurs cellulaires des protéines de l'ECM et ceux des BMPs peuvent influencer la signalisation et la différenciation des cellules osseuses, d'où l'intérêt de fonctionnaliser les biomatériaux non seulement avec des molécules d'adhésion, mais aussi avec des BMPs ou leurs peptides dérivés.

Dans ce projet, un biomatériau biomimétique de 3ème génération a été développé afin de permettre l'adhésion et l'orientation des cellules souches vers la lignée ostéoblastique. L'étude a consisté à analyser le potentiel de la co-immobilisation d'un peptide d'adhésion dérivé de la fibronectine (pFibro) et d'un peptide dérivé de la BMP-9 (SpBMP-9) sur un film de polycaprolactone (PCL). L'utilisation d'un peptide négatif du SpBMP-9, le NSpBMP-9, a permis de vérifier les effets synergiques potentiels de cette co-immobilisation. Dans un premier temps, l'attachement et l'organisation du cytosquelette des cellules ont été déterminés par un immunomarquage des protéines du cytosquelette. Puis la cinétique d'activation de la voie de signalisation Smad impliquée dans la différenciation ostéoblastique a été analysée par immunobuvardage de type Western. Afin de vérifier la différenciation des cellules souches vers un phénotype défini, l'expression de gènes codant pour des marqueurs de différenciation ostéogénique (Runx2, Ostérix), chondrogénique (Sox9) et adipogénique (PPAR γ) a également été évaluée par des immunobuvardages de type Western.

Ce projet de recherche a amélioré les connaissances actuelles sur les interactions entre les biomatériaux co-fonctionnalisés par des peptides d'adhésion et dérivés de la BMP-9 et les cellules osseuses, afin de potentialiser les propriétés ontéoconductive, ostéointégrative et ostéoinductive essentielles pour obtenir un matériau biomimétique efficace.

Mots-clés: tissu osseux, matériau biomimétique, co-immobilisation, peptide d'adhésion, protéine morphogénétique osseuse, différenciation ostéoblastique, Smad, points focaux.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de maîtrise, la Professeure Nathalie Fauchaux, qui m'a accordé sa confiance et m'a si bien accueillie dans son groupe de recherche sur les systèmes biohybrides cellules-biomatériaux de l'Université de Sherbrooke. L'ensemble de son savoir, ses nombreux conseils, sa disponibilité, son écoute et son soutien m'ont guidée tout au long de mon projet de maîtrise. Je souhaite aussi remercier le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie (CRSNG) du Canada qui a fourni les subventions nécessaires à la réalisation de cette étude.

Je voudrais tout particulièrement remercier Marc-Antoine Lauzon et Olivier Drevelle pour l'aide continue qu'ils m'ont apporté, leurs judicieux conseils, leur enthousiasme quotidien et la bonne ambiance qu'ils apportent au laboratoire. Je ne saurais oublier tous les autres membres et stagiaires du laboratoire: Sabrina Beauvais, Hamid Hassanisaber, Sabrina Neron, Hereiti Hunter, Yanick Blain et Marie-Eve Kiefer. Merci pour votre bonne humeur et l'entraide constante qui règne dans ce bel équipage de Pirates. Rrrrrh !!

Un grand merci également à Isabelle Arsenault, Valérie Larouche, Serge Gagnon et Stéphane Guay pour leur bonne humeur et leur soutien technique au laboratoire.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude aux membres de ma famille et à mes amis, qui m'ont encouragée et soutenue inconditionnellement, dans les bons comme dans les moins bons moments. Une petite pensée pour les membres du côté *Lumineux* de la Force et mon partenaire de café sans qui je n'aurais pu prospérer dans l'*Obscurité*.

Finalement, je voudrais remercier les membres du jury, Professeure Nathalie Fauchaux, Professeur Gervais Soucy, Professeur Denis Groleau et Professeur Bernard Marcos pour l'attention prise à la lecture et à l'évaluation de mon mémoire.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
REMERCIEMENTS	iii
LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES TABLEAUX	ix
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	1
1.1 Mise en contexte et projet de recherche	1
1.2 Hypothèse de recherche	4
1.3 Objectif principal	4
1.4 Contributions originales	6
1.4.1 État de l'art	6
1.5 Plan du document	8
CHAPITRE 2 ÉTAT DE L'ART	9
2.1 Tissu osseux	9
2.1.1 Physiologie structurale et réparation osseuse	9
2.1.2 Facteurs matriciels influençant la réparation osseuse	21
2.1.3 Facteurs de croissance et signalisation	29
2.2 Matériaux biomimétiques	41
2.2.1 Les cellules utilisées en combinaison avec les matériaux biomimétiques	41
2.2.2 Les différents types de matériaux servant de substituts osseux	44
2.2.3 Les molécules bioactives	46
CHAPITRE 3 DIFFÉRENCIATION OSTÉOBLASTIQUE DE CELLULES SOUCHES MURINES SUR DES FILMS DE POLY(EPILON)CAPROLACTONE BIOMIMÉTIQUES	53
3.1 Avant-propos	53
3.2 Abstract	55
3.3 Introduction	55
3.4 Materials	58
3.5 Methods	58
3.5.2 Assessing peptide density on PCL films	59
3.5.3 Cell experiments	60
3.5.4 Staining of actin stress fibers, DNA and immunolabelling of vinculin, pFAK and Smad	60
3.5.5 Western blot analysis of Smad 1/5 phosphorylation	61
3.5.6 Western blot analysis of Runx2, Osterix, Sox9 and PPAR γ	62
3.5.7 Statistical analysis	62
3.6 Results	62
3.6.1 Peptide density on functionalized films	62
3.6.2 Effect of PCL functionalized with different peptides on the attachment and spreading of murine multipotent C3H10T1/2 cells	62
3.6.3 Effect of PCL functionalized with pFibro and/or SpBMP-9 on focal adhesion point in attached C3H10T1/2 cells	65

3.6.4	Influence of PCL functionalized with pFibro and/or SpBMP-9 on the activation of the canonical Smad signaling pathway and the translocation of psmad to the nucleus	66
3.7	Discussion.....	69
3.8	Conclusion.....	72
3.9	Acknowledgments	73
CHAPITRE 4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES		75
4.1	Conclusion.....	75
4.2	Perspectives	76
4.2.1	Influence du biomatériau co-fonctionnalisé sur d'autres types de cellules souches	76
4.2.2	Influence du matériau co-fonctionnalisé sur d'autres voies de signalisation	77
4.2.3	Stimulation des MSCs adhérentes par IGF-2	77
4.2.4	Matériau biomimétique en 3D co-fonctionnalisé	78
ANNEXE A – SUPPLEMENTARY TABLE		80
ANNEXE B – SUPPLEMENTARY FIGURE		81
LISTE DES RÉFÉRENCES		82

LISTE DES FIGURES

Figure 2.1	Structure d'un os long	10
Figure 2.2	Structure de l'os compact (A) et de l'ostéon (B)	11
Figure 2.3	Différenciation des lignées ostéoformatrice (A) et ostéorésorbante (B)	13
Figure 2.4	Cycle du remodelage osseux	14
Figure 2.5	Structure et fonctionnement d'un ostéoclaste pendant le remodelage osseux	15
Figure 2.6	Les phases de la réparation osseuse	20
Figure 2.7	Adhésion et communication intercellulaire.....	21
Figure 2.8	Structure et activation d'une intégrine	26
Figure 2.9	Activation de la FAK	28
Figure 2.10	Expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique.....	30
Figure 2.11	Voies de signalisation des Wnts.....	32
Figure 2.12	Régulation de la signalisation induite par les BMPs.....	38
Figure 3. 1-	Attachment and spreading of C3H10T1/2 cells on PCL-Hydro, PCL-pFibro, PCL-pFibro/SpBMP9, PCL-SpBMP9, PCL-pFibro/NSpBMP9 or PCL-NSpBMP9 incubated for 0.5h, 1h, 2h or 4 h in serum-free medium. (A) C3H10T1/2 cells attached to PCL films were stained with Rhodamine-Phalloidin to label actin cytoskeleton (F-actin, red) and DAPI to label nuclei (blue). Bar = 100 µm (representative of 3 independent experiments). (B) Counting of C3H10T1/2 cells attached to PCL films. For each experimental condition, one hundred images were analysed under an epifluorescence microscope (10x objective). Results are means ± standard errors of the mean (SEM) of three independent experiments. (C) Kinetics of C3H10T1/2 cell spreading. For each experimental condition eighty images were analysed under an epifluorescence microscope (40x objective). Results are means ± SEM of three independent experiments (**p<0.001).	64
Figure 3. 2 -	Focal adhesion points in C3H10T1/2 cells attached to PCL films functionalized with (PCL-pFibro, PCL-pFibro/SpBMP9, PCL-SpBMP9, PCL-pFibro/NSpBMP9 or PCL-NSpBMP9), or not functionalized (PCL-Hydro) after incubation for 4h in serum-free medium. (A) C3H10T1/2 cells were stained with Alexa Fluor® 594 phalloidin (F-actin, red), DAPI (nucleus; blue) and mouse anti-vinculin antibodies (green). (B) Cells were stained with rabbit antibodies	

	against Y397 pFAK (green), Alexa Fluor® 594 phalloidin (F-actin, red) and DAPI (nuclei; blue). Bar = 100 µm. Results are representative of two independent experiments.	65
Figure 3.3 - (A)	Smad1/5 phosphorylation (pSmad) in adhered C3H10T1/2 cells analysed by Western blotting and densitometry. C3H10T1/2 cells were incubated for 0.5h, 1h, 2h or 4 h in serum-free medium on PCL-Hydro, PCL-pFibro, PCL-pFibro/SpBMP9, PCL-SpBMP9, PCL-pFibro/NSpBMP9 or PCL-NSpBMP9. Results are means ± SEM of three independent experiments. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. (B) Immunolabelling of pSmad 1/5 in the nuclei of attached cells incubated for 4h in serum-free medium. C3H10T1/2 cells were stained with Alexa Fluor® 594 phalloidin (F-actin, red), DAPI (nucleus; blue) and rabbit anti-pSmad 1/5 antibodies (green). Bar = 100 µm. This experiment is representative of two independent experiments.	67
Figure 3. 4 -	Differentiation of C3H10T1/2 cells attached to PCL-Hydro, PCL-pFibro, PCL-pFibro/SpBMP9, PCL-SpBMP9, PCL-pFibro/NSpBMP9 or PCL-NSpBMP9 and incubated for 3 and 6 d in medium supplemented with 1%FBS. Early osteogenic (Runx2, Osx) and chondrogenic (Sox9) markers in adhered C3H10T1/2 cells were revealed by Western blotting. This experiment is representative of three independent experiments.	68
Supplementary figure 1:	Expression of transcription factor PPARγ gene	81

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 - Objectifs généraux et spécifiques du projet de recherche	5
Tableau 1.2 - But et méthodologie associés aux objectifs spécifiques de l'étude	5
Tableau 2.1 - Les protéines non collagènes de la matrice extracellulaire osseuse.....	24
Tableau 2.2 - Effet ostéogénique des BMPs (Adapté de Drevelle, 2013).....	34
Tableau 2.3 - Sous-familles et récepteurs des BMPs	37
Tableau 2.4 - Les matériaux utilisés en régénération osseuse : avantages et inconvénients....	45
Tableau 2.5 - Ciblage d'intégrines spécifiques pour améliorer la réponse cellulaire induite par les facteurs de croissance	49
Tableau 3.1 – Peptide density on PCL film.....	60
Supplementary table 1: Differences (Tukey-Kramer test) between treated PCL films.	80

LISTE DES ACRONYMES

Acronyme	Définition
ActR	Récepteur de l'activine
AdBMP	BMP produite par adénovirus
ADMIDAS	Adjacent to MIDAS
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADSC	Cellules souches dérivées d'adipocytes
ALK	<i>Activin receptor-like kinase</i>
ALP	Phosphatase alcaline
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ASARM	<i>Acidic serine-rich and aspartate-rich motif</i>
BAMBI	<i>BMP and activin membrane-bound inhibitor</i>
BMP	Protéine morphogénétique osseuse
BMPR	Récepteur des BMPs
BRU	Unité de remaniement osseux
BSA	Albumine de sérum bovin
BSP	Sialoprotéine osseuse
Ca²⁺	Calcium
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
CHO	Cellules ovariennes de hamsters chinois
CK1α	<i>Casein kinase 1 α</i>
co-Smad	<i>Common-mediator Smad</i>
CS	Chondroïtine sulfate
DAPI	4',6-diamidino-2-phénylindole
DEP	<i>Dvl, Egl-10 et Pleckstrin</i>
DIX	Dvl et Axine
Dkk	Dickkopf
Dlx5	<i>Distal-less homeobox 5</i>
DPR	Définition du projet de recherche
Dvl	Dishevelled
ECM	Matrice extracellulaire
EDC	1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide hydrochloride
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ES	Cellules souches embryonnaires
FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>

FASL	FAS ligand
FAT	<i>Focal adhesion targeting</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FERM	<i>Four-point-one, ezrin, radixin, moesin</i>
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
FITC	Isothiocyanate de fluorescéine
Fzd	Récepteur Frizzled
GAG	Glycosaminoglycanes
Gla	Acide γ -carboxyglutamique
GSK-3β	Glycogène synthase kinase-3 β
HA	Acide hyaluronique
HAP	Hydroxyapatite
HCl	Acide chlorhydrique
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IAC	<i>Integrin adhesion complexe</i>
IFN	Interféron
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL	Interleukine
iPS	Cellules souches pluripotentes induites
I-Smad	Inhibiteur de Smad
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LEF	<i>Lymphoid enhancer-binding factor</i>
LRP 5/6	<i>Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6</i>
LSBCB	Laboratoire de systèmes biohybrides cellules-biomatériaux
M-CSF	<i>Macrophage-colony stimulating factor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MEPE	<i>Matrix extracellular phosphoglycoprotein</i>
MIDAS	<i>Metal ion-dependent adhesion site</i>
MKK	MAPKinase kinase
MMP	Métalloprotéases matricielles
MSCs	Cellules stromales mésenchymateuses
MVs	Microvésicules
NaOH	Hydroxyde de sodium
NF-κB	Nuclear factor-kappaB
OC	Ostéocalcine
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

OPN	Ostéopontine
Osx	Ostérix
PBS	Tampon phosphate salin
PCL	Polycaprolactone
PDZ	<i>Postsynaptic density-95, Discs-large and Zonula occudens-1</i>
PDEA	2-(2-pyridinyldithio) ethaneamine hydrochloride
PDGF	<i>Platelet-derived growth factor</i>
PET	Polyéthylène téréphtalate
PGE2	Prostaglandine E2
PLA	Acide polylactique
PM	Poids moléculaire
PO₄³⁻	Phosphate
PSI	<i>Plexin-semaphorin integrin</i>
PTH	Hormone parathyroïdienne
qPCR	<i>Real-time polymerase chain reaction</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa β ligand</i>
RhoA	<i>Ras homolog family member A</i>
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SDS	Dodécylsulfate de sodium
Sema4D	Semaphorine 4D
sFRP	<i>Secreted frizzled-related protein</i>
SIBLING	<i>Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins</i>
SLRP	<i>Small leucine-rich proteoglycans</i>
Smurf-1	<i>Smad ubiquitination regulatory factor-1</i>
Src	<i>Rous sarcoma oncogene cellular homolog</i>
SyMBS	<i>Synergistic metal ion binding site</i>
TAB1	<i>TAK binding protein 1</i>
TAK1	<i>TGF-β activated kinase 1</i>
TCF	<i>T-cell-factor</i>
Ti	Titane
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
TRAP	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
UV	Ultraviolet
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WIF	<i>Wnt inhibitory factor</i>
XPS	Spectrométrie de photoélectrons X

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

1.1 Mise en contexte et projet de recherche

Avec l'amélioration de l'espérance de vie, le nombre de personnes dans le monde âgées de plus de 65 ans a considérablement augmenté (World Health Organization 2014; Public Health Agency of Canada 2014). Aux États-Unis, le nombre d'américains âgés de plus de 65 ans devrait doubler pour atteindre 98.2 millions d'ici 2060 (Federal Interagency Forum on Aging-Related Statistics 2016). Cette catégorie d'âge est la plus touchée par les maladies squelettiques telles que les métastases secondaires causant des cancers osseux ou les fractures ostéoporotiques, principales causes de douleurs et d'invalidité (World Health Organization 2003; McPhee et al. 2016). En effet, 80 % des fractures occasionnées chez les personnes de plus de 50 ans sont causées par l'ostéoporose (Ostéoporose Canada). De plus, la majorité des pertes osseuses liées à l'ostéoporose (particulièrement lors des fractures de vertèbres ou de pseudarthroses) peuvent s'avérer difficile à réparer engendrant non seulement une diminution de la qualité de vie des personnes atteintes, mais également un véritable gouffre financier. Plus d'un million de procédures chirurgicales orthopédiques incluant les réparations de fractures, les greffes osseuses et les exérèses partielles de l'os sont effectuées chaque année aux États-Unis ce qui représente un coût d'environ 8,2 milliards de dollars US (Sathiyakumar et al. 2014; Kretlow & Mikos 2007).

Les structures osseuses sont des supports de base pour la locomotion, des sites de fixation des muscles, des ligaments et des tendons; ils fournissent un soutien mécanique et protègent les organes vitaux (Marieb & Hoehn 2015). La moelle osseuse est également un site majeur de l'hématopoïèse et un important réservoir de minéraux (Marquis et al. 2009; Nilsson et al. 2001). Idéalement, pour combler ces fractures et ces pertes osseuses, des substituts osseux biocompatibles, ostéointégratifs, ostéoconductifs et ostéoinductifs devraient être utilisés (Marquis et al. 2009). L'ostéointégration implique de fortes interactions avec le tissu osseux d'accueil. Actuellement, l'autogreffe ou l'allogreffe sont utilisées puisqu'elles sont ostéoconductrices, c'est à dire facilement colonisées par le tissu osseux et les vaisseaux sanguins. Elles sont également ostéoinductrices, c'est à dire capables de stimuler la différenciation des cellules stromales mésenchymateuses (MSCs) en ostéoblastes, cellules

formant le tissu osseux grâce à l'action de facteurs de croissance comme les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) (Giannoudis et al. 2005; Cypher & Grossman 1996). L'autogreffe est le standard en or privilégié lors de greffe chirurgicale. Cependant son application est tributaire de la quantité d'os pouvant être prélevé sur un même patient et par les complications postopératoires (ruptures de nerf, perte abondante de sang, morbidité, douleurs chroniques aux sites donneur et/ou receveur) observées dans 8,5 à 20 % des cas (Giannoudis et al. 2005; Dimitriou et al. 2011). Les allogreffes sont également communément utilisées (Giannoudis et al. 2005). Contrairement aux autogreffes qui utilisent les tissus osseux vivants provenant directement des patients à soigner, les allogreffes sont prélevées de cadavres ou d'autres individus. Ces allogreffes doivent donc être congelées dans l'azote liquide et sont soumises à une série de traitements afin de nettoyer (NaHCO_3 , H_2O_2 , NaOH), conditionner et stériliser le greffon avant son implantation (Dumas et al. 2006). Ces traitements diminuent les risques de transmission d'infection par des allogreffes (Graham et al. 2010), le risque de transmission du VIH étant estimé à 1 sur 2,8 milliards, mais ils ont des conséquences non négligeables sur les propriétés biologiques du greffon. Ils réduisent non seulement les propriétés d'ostéointégration, ostéoinduction et d'histocompatibilité en affectant l'intégralité des protéines endogènes, mais également les propriétés mécaniques en altérant la résistance structurale du greffon (Dumas et al. 2006; Barth et al. 2011; Speirs et al. 1999).

Afin de pallier ces problèmes, des biomatériaux ayant des propriétés similaires aux greffes osseuses ont été développés (Hench 2002). Les biomatériaux peuvent être constitués de matières inorganiques (hydroxyapatite [HAP] ou titane [Ti]), de polymères naturels (collagène ou alginate), de polymères synthétiques (polycaprolactone [PCL]) ou d'une combinaison de ces matériaux (Marquis et al. 2009). Les matériaux inorganiques, comme les céramiques calcium-phosphate, sont utilisés pour mimer les mêmes propriétés (architecturale, mécanique et biologique) que l'os minéral et induisent peu de réponses immunitaires lors de l'implantation *in vivo* (Drevelle & Fauchoux 2013; Oonishi et al. 1999; Matesanz et al. 2014). Toutefois, leur solubilité peut augmenter l'activité des ostéoclastes responsables de la résorption osseuse (Hench 2002; Monchau et al. 2002). D'autres matériaux, tels que les polymères synthétiques, possèdent la capacité de se résorber lentement et peuvent être remplacés progressivement par les tissus néosynthétisés lors de la guérison osseuse (Hench & Thompson 2010). Toutefois, l'utilisation seule de ces matériaux ne permet pas la formation d'interactions stables avec les

cellules (Marquis et al. 2009). Afin de favoriser ces interactions, les biomatériaux peuvent, par exemple, être fonctionnalisés par des protéines d'adhésion de la matrice extracellulaire (ECM) ou des peptides dérivés (Hench 2002; Pryor et al. 2009; He et al. 2008). Le potentiel thérapeutique de ces matériaux biomimétiques dépend de leur capacité à contrôler l'adhésion et le devenir des cellules stromales mésenchymateuses (MSCs) (Pryor et al. 2009). Ces phénomènes sont médiés par les interactions entre les intégrines (récepteurs sur les membranes des cellules) et les protéines/peptides présents à la surface des matériaux biomimétiques (Reyes & García 2004; Carvalho et al. 2003).

Des facteurs de croissance spécifiques, comme les protéines morphogénétiques osseuses (BMPs), sont souvent utilisés en combinaison avec les matériaux biomimétiques afin d'induire la différenciation de MSCs en cellules formant l'os ou ostéoblastes (Nakase & Yoshikawa 2006). En effet, il existe des relations croisées entre les intégrines et les récepteurs cellulaires des BMPs ayant une influence sur la signalisation des cellules osseuses (Hamidouche et al. 2010). Mais les connaissances actuelles sur ces phénomènes sont assez limitées.

Seuls certains BMPs ont une activité ostéogénique, comme les BMP 2/4/6/7/9 (Lavery et al. 2008; Bessa et al. 2008; Cheng et al. 2003). L'agence américaine des produits alimentaires et médicaux (FDA) a approuvé l'utilisation de la BMP-2 pour la réparation de fractures du tibia et la fusion de vertèbres (Food and Drug Administration 2002). Cheng *et al* ont montré que la BMP-9 était plus efficace que la BMP-2 et la BMP-7 à induire la différenciation des MSCs murines en ostéoblastes (Cheng et al. 2003). Cependant, l'utilisation des BMPs en combinaison avec des matériaux biomimétiques demeure très dispendieuse. Plusieurs équipes ont donc développé des peptides dérivés de la BMP-2 et de la BMP-7 (Saito et al. 2003; Chen & Webster 2009).

La BMP-9 étant plus ostéoinductive que la BMP-2 et la BMP-7, l'équipe de recherche de la professeure Nathalie Fauchoux (Chaire de recherche du Canada sur les systèmes biohybrides cellules-biomatériaux [2004-2014]), de la Faculté de génie à l'Université de Sherbrooke, a développé des peptides dérivés de la BMP-9 (pBMP-9, SpBMP-9) très peu dispendieux (300 fois moins chers que la protéine native) capables d'induire une différenciation ostéoblastique *in vitro* et une formation osseuse *in vivo* (Bergeron et al. 2007; Bergeron et al. 2009; Bergeron et al. 2012; Beauvais et al. 2016; Marquis et al. 2008). Ainsi des films de PCL fonctionnalisés par un peptide dérivé de la fibronectine (pFibro) ciblant les intégrines $\alpha 5\beta 1$ augmentaient, par

rapport à un peptide dérivé de la sialoprotéine osseuse (pBSP) ciblant les intégrines $\alpha\text{v}\beta\text{3}$, l'adhésion et la différenciation précoce des MSCs murines induite par 1 nM de BMP-9 ou de ses peptides dérivés (pBMP-9, SpBMP-9) (Beauvais et al. 2016). De plus, en combinaison avec la BMP-9 ou ses peptides dérivés, le peptide pFibro a amélioré l'activation des voies de signalisation des Smad et des MAPK chez les MSCs murines (Beauvais et al. 2016).

1.2 Hypothèse de recherche

Les cellules souches, tels que les MSCs, sont capables de s'auto-renouveler et de générer des cellules différenciées spécialisées. Leur utilisation sur des matériaux biomimétiques serait très prometteuse pour la régénération osseuse. La stratégie récemment explorée consiste à concevoir des biomatériaux fonctionnalisés avec des peptides d'adhésion agissant en synergie avec des facteurs de croissance ajoutés en solution. Afin de contrecarrer les conséquences néfastes de l'utilisation de surdoses de BMPs, il serait intéressant d'immobiliser directement ces molécules actives ou peptides dérivés sur les matériaux biomimétiques. Ce procédé permettrait également d'étudier les interactions intégrine spécifique- récepteur BMP pour optimiser la différenciation des MSCs et confectionner des matériaux biomimétiques plus performants.

Ainsi, le projet de recherche repose sur deux hypothèses:

- 1) Un peptide dérivé des BMPs (SpBMP-9) garde ses propriétés ostéoinductrices lorsqu'il est immobilisé sur un matériau biomimétique.
- 2) La co-immobilisation d'un peptide d'adhésion dérivé de la fibronectine et d'un peptide dérivé de la BMP-9 (SpBMP-9) sur un film de polycaprolactone potentialise l'adhésion et la réponse ostéoblastique des cellules stromales mésenchymateuses murines.

1.3 Objectif principal

Ce projet de recherche consiste à développer des films de PCL fonctionnalisés par des peptides d'adhésion (pFibro) et/ou des peptides dérivés de la BMP-9 (SpBMP-9 ou contrôle négatif NSpBMP-9) afin de concevoir un matériau biomimétique ostéoinducteur. Le potentiel d'adhésion et l'efficacité ostéoinducteur du matériau biomimétique ont été évalués sur des cellules souches murines appelées C3H10T1/2. Le projet de recherche est divisé en 3 objectifs

principaux, eux-mêmes subdivisés en plusieurs objectifs spécifiques (Tableau 1.1). La méthodologie utilisée pour répondre à ces objectifs est présentée dans le Tableau 1.2.

Tableau 1.1 - Objectifs généraux et spécifiques du projet de recherche

Objectifs principaux	Objectifs spécifiques
1. Caractérisation et préparation d'un matériau biomimétique co-fonctionnalisé par des peptides (pFibro) ciblant des intégrines spécifiques et des peptides dérivés du facteur de croissance BMP-9 (SpBMP-9 ou NSpBMP-9)	1.1. Préparer des films de polycaprolactone co-fonctionnalisés
	1.2. Déterminer la densité des peptides (pFibro et/ou SpBMP-9 ou NSpBMP-9) greffés aux films de PCL
2. Déterminer l'efficacité d'adhésion des films de PCL co-fonctionnalisés par pFibro et SpBMP-9 sur les cellules multipotentes murines C3H10T1/2	2.1. Déterminer le nombre de cellules C3H10T1/2 adhérant aux films de PCL et analyser leur étalement cellulaire
	2.2. Évaluer la formation des points focaux d'adhésion (vinculine, pFAK) dans les cellules C3H10T1/2 attachées aux films de PCL
3. Déterminer le potentiel de différenciation ostéoblastique des cellules C3H10T1/2 adhérées aux films de PCL co-fonctionnalisés par les peptides pFibro et SpBMP-9	3.1. Évaluer la capacité des films de PCL co-fonctionnalisés à induire l'activation de la voie de signalisation des Smad 1/5 et leur translocation nucléaire
	3.2. Déterminer l'orientation de la spécialisation des cellules C3H10T1/2 adhérant aux films de PCL

Tableau 2.2 - But et méthodologie associés aux objectifs spécifiques de l'étude

Objectifs spécifiques	But	Méthodologie
1.1. Préparer des films de polycaprolactone co-fonctionnalisés	Immobiliser des peptides d'adhésion (pFibro) et/ou des peptides dérivés de la BMP-9 (SpBMP-9 ou NSpBMP-9) sur des films de PCL en 2D	Fonctionnalisation de la surface du PCL selon un protocole publié dans <i>Drevelle et al, 2010</i>
1.2. Déterminer la densité des peptides (pFibro et/ou SpBMP-9 ou NSpBMP-9) greffés aux films de PCL	Déterminer la densité de peptides (SpBMP-9 et NSpBMP-9) immobilisés sur les films de PCL	Quantification des peptides présents dans les solutions mères utilisées dans la dernière étape de fonctionnalisation des films de PCL par chromatographie liquide à haute performance (HPLC)
	Déterminer la densité de peptides fluorescents (pFibro-FITC) immobilisés sur les films de PCL	Fonctionnalisation des films de PCL par des peptides fluorescents (pFibroFITC) pouvant être quantifiés par spectroscopie à fluorescence
2.1. Déterminer le nombre de cellules C3H10T1/2 adhérant aux films de PCL et analyser leur étalement cellulaire	Compter les C3H10T1/2 adhérant aux différents films de PCL	Immunomarquage des filaments d'actine et du noyau et observation au microscope à épifluorescence. À partir des observations microscopiques, comptage des noyaux pour déterminer le nombre de cellules adhérentes aux films de PCL (nombre / mm ²)
	Évaluer la capacité d'étalement cellulaire sur les films de PCL	À partir des observations microscopiques, analyse par MATLAB de l'étalement (μm ²) des cellules adhérentes

	Visualiser l'organisation des protéines du cytosquelette des cellules adhérentes	À partir des observations microscopiques des immunomarquage des filaments d'actine
2.2. Évaluer la formation des points focaux d'adhésion (vinculine, pFAK) dans les cellules C3H10T1/2 attachées aux films de PCL	Observer et évaluer la formation de points focaux d'adhésion par les C3H10T1/2 adhérentes aux films de PCL	Immunomarquage de la vinculine et de la FAK phosphorylée sur Y ³⁹⁷ et observation au microscope à épifluorescence
3.1. Évaluer la capacité des films de PCL co-fonctionnalisés à induire l'activation de la voie de signalisation des Smad 1/5 et leur translocation nucléaire	Mesurer l'activation de la principale voie de signalisation des BMPs: la voie canonique des Smad 1/5	Évaluation du niveau de Smad 1/5 phosphorylées par immunobuvardages de type Western et analyse densitométrique
	Valider la translocation au noyau des Smad 1/5 phosphorylées	Immunomarquages du noyau et des Smad 1/5 phosphorylées et observation au microscope à épifluorescence
3.2. Déterminer l'orientation de la spécialisation des cellules C3H10T1/2 adhérent aux films de PCL	Analyser l'expression de marqueurs précoces de différenciation ostéogénique (Runx2, Ostérix), chondrogénique (Sox9) et adipogénique (PPAR- γ)	Immunobuvardages de type Western pour les marqueurs précoces de différenciation cellulaire et le gène de référence GAPDH

1.4 Contributions originales

Les connaissances acquises lors de cette maîtrise m'ont permis de contribuer à la rédaction d'une revue de la littérature sur les matériaux biomimétiques (Beauvais et al, 2016) et les résultats obtenus au cours du projet de recherche ont été présentés au *World Biomaterials Congress 2016* et ont donné lieu à la soumission d'un article scientifique (Chapitre 3) dans la revue *Tissue Engineering Part A*.

1.4.1 État de l'art

Suite à l'invitation de l'éditeur en chef du journal, l'article de revue *Bone cells-biomaterials interactions* publié par Marquis *et al.* dans la revue *Frontiers in Bioscience* en 2009 a été mise à jour par Beauvais *et al.* en 2016. Cette revue de littérature porte sur les interactions entre les cellules osseuses et les biomatériaux.

- Une introduction met en contexte et présente rapidement les différents acteurs jouant un rôle dans les interactions cellules osseuses-biomatériaux.
- Une description des cellules et autres composantes du tissu osseux est présentée.

- Les régulations impliquées dans les processus de réparation, de remodelage et de différenciation ostéoblastique sont exposées.
- Les composants de l'adhésome et la formation d'adhésions focales et fibrillaires permettant aux cellules d'adhérer au biomatériau sont détaillés.
- L'impact des relations croisées entre les intégrines ciblant différentes protéines de la matrice extracellulaire (ECM) osseuse et les facteurs de croissance est décrit.
- Les nouvelles stratégies de développement de matériaux biomimétiques fonctionnalisés par des peptides d'adhésion et utilisés en combinaison ou non avec des facteurs de croissance afin d'améliorer la réparation osseuse sont présentées et discutées.

Lors de l'écriture de cette revue de littérature, mes contributions se sont portées sur le premier et le dernier point énoncés ci-dessus.

1.4.2 Différenciation ostéoblastique de cellules souches murines sur des films de poly(epsilon)caprolactone biomimétiques

Le chapitre 3 met en évidence l'impact de la co-immobilisation sur des films de poly(epsilon)caprolactone (PCL) d'un peptide d'adhésion dérivé de la fibronectine (pFibro) et d'un peptide dérivé de la BMP-9 (SpBMP-9), en termes d'adhésion, d'activation de la voie de signalisation cellulaire des Smad 1/5 et de différenciation des cellules souches murines multipotentes C3H10T1/2. Les résultats obtenus font l'objet d'un article soumis dans la revue *Tissue Engineering Part A*.

- La co-localisation des peptides pFibro et SpBMP-9 sur les films de PCL promeut l'adhésion cellulaire en permettant une meilleure organisation des points focaux d'adhésion et du cytosquelette d'actine des cellules C3H10 T1/2.
- Le peptide SpBMP-9, dérivé du facteur de croissance BMP-9, garde ses propriétés ostéoinductives lorsqu'il est immobilisé sur les films de PCL.
- Les films de PCL fonctionnalisés avec le SpBMP-9 (PCL-SpBMP-9 et PCL-pFibro/SpBMP-9) améliorent l'activation et la translocation de la voie canonique des Smad 1/5.
- Les films de PCL fonctionnalisés avec le SpBMP-9 (PCL-SpBMP-9 et PCL-pFibro/SpBMP-9) renforcent l'expression de Runx2, un facteur de transcription

essentiel dans la différenciation ostéoblastique, sans induire la spécialisation des cellules souches murines en adipocytes.

- Les relations croisées entre les intégrines reconnaissant le pFibro et les récepteurs du SpBMP-9 ont amélioré à la fois l'adhésion et la différenciation ostéoblastique des cellules souches murines. Ainsi, la co-fonctionnalisation de la surface de matériaux par les peptides pFibro et SpBMP-9 semble être une approche prometteuse pour le développement de matériaux biomimétiques utilisés dans des applications cliniques ou d'ingénierie tissulaire osseuse.

1.5 Plan du document

Ce mémoire de maîtrise se divise en 4 parties. Le premier chapitre permet de mettre en contexte les principaux acteurs intervenant dans le processus de réparation des pertes osseuses et présente l'hypothèse et les objectifs reliés à ce projet de recherche sur la conception de matériaux biomimétiques. Ce chapitre expose également les contributions originales de ce projet de maîtrise au sein de la communauté scientifique. Le chapitre 2 est une revue de la littérature qui met en évidence les phénomènes intervenant au niveau du tissu osseux, en décrivant le rôle et la fonction de ces principaux constituants et en discutant des dernières avancées scientifiques dans la conception de matériaux biomimétiques pour des applications d'ingénierie tissulaire osseuse. Ce chapitre permet d'avoir une meilleure compréhension des travaux exposés dans le chapitre 3. Le chapitre 3 présente les résultats de recherche obtenus lors de ce projet de maîtrise sur la conception d'un matériau biomimétique à base de films de PCL co-fonctionnalisés avec les peptides pFibro et SpBMP-9 afin de favoriser l'adhésion et la différenciation ostéoblastique des cellules multipotentes murines C3H10T1/2. Ces résultats ont été diffusés sous la forme d'un article scientifique soumis dans la revue *Acta Biomaterialia*. La conclusion finale et les perspectives de recherche de ce projet de maîtrise sont présentées dans le chapitre 4.

CHAPITRE 2 ÉTAT DE L'ART

Le tissu osseux joue plusieurs rôles physiologiques essentiels en assurant des fonctions mécaniques et métaboliques au sein du corps humain (Florencio-silva et al. 2015). Ses fonctions mécaniques consistent à apporter, de par sa structure solide, un soutien rigide au corps humain. Il sert d'ancrage à tous les organes mous tels que les muscles et les protège également des contraintes mécaniques internes et externes (contractions musculaires) (Marieb & Hoehn 2015). Ce tissu est le lieu d'attachement des ligaments, des tendons et des muscles squelettiques permettant ainsi la locomotion de l'organisme. Étant un tissu dynamique en perpétuel remodelage, il assure des fonctions métaboliques en contrôlant l'homéostasie phosphocalcique de l'organisme, conjointement avec l'intestin et les reins (Datta et al. 2008; Marieb & Hoehn 2015). Lors d'un déséquilibre minéral ou sous l'effet de pressions mécaniques, il permet la libération ou le stockage de minéraux essentiels, tel que le calcium, impliqué notamment dans les phénomènes de suivi cellulaire, de coagulation sanguine et de transmission nerveuse (Robling et al. 2006; Marieb & Hoehn 2015). Ainsi, 99 % du calcium et 90 % du phosphore de notre organisme sont stockés dans notre squelette (Marieb & Hoehn 2015). De plus, c'est au niveau de la moelle osseuse présente dans la cavité médullaire de l'os, que se déroule l'hématopoïèse, assurant la formation des globules rouges (érythrocytes), des globules blancs (leucocytes) et des plaquettes (thrombocytes) (Nilsson et al. 2001).

2.1 Tissu osseux

2.1.1 Physiologie structurale et réparation osseuse

2.1.1.1 Histologie du tissu et cellules osseuses

2.1.1.1.1 Histologie osseuse

Le squelette humain renferme plus de 200 os, classés selon leur forme : les os longs (humérus, tibia, fémur), les os courts (poignées [carpes], chevilles [tarse]), les os plats (sternum, omoplates, côtes, crâne) et les os irréguliers (vertèbre) (Marieb & Hoehn 2015). Les os longs sont divisés en trois régions selon leur ordre d'apparition sur l'axe longitudinal de l'os : l'épiphyse (région à l'extrémité), la métaphyse (région intermédiaire) et la diaphyse (région centrale) (Figure 2.1). La zone périphérique de l'os long est composée d'un tissu compact (os cortical), entourant une zone interne constituée d'un tissu spongieux (os trabéculaire).

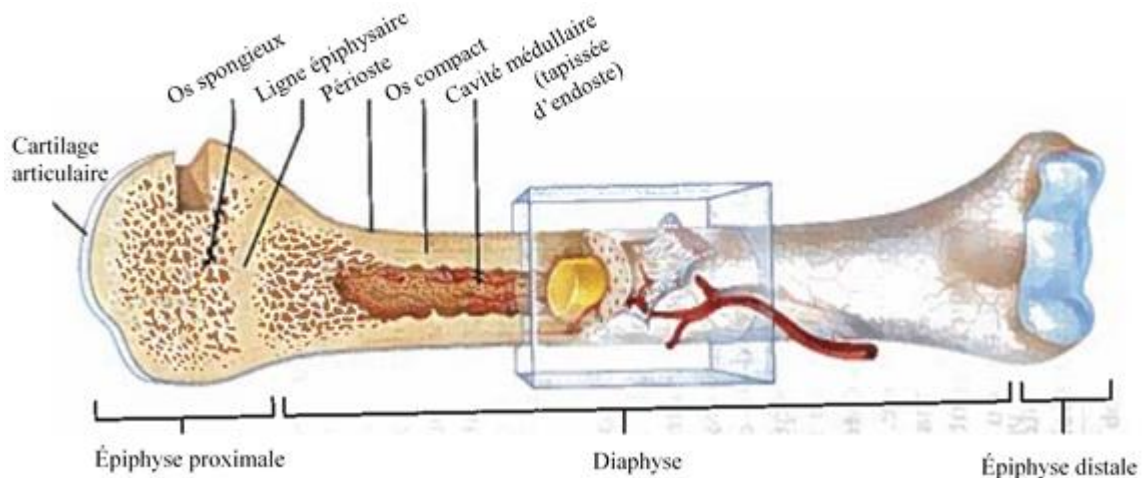


Figure 2.1 - Structure d'un os long (reproduction autorisée: Marieb & Hoehn 2015)

L'os compact représente 80 % de la masse osseuse totale (Marieb & Hoehn 2015). Il correspond à la partie la plus dense de notre squelette (5 à 10 % de porosité) (Martin et al. 1998). L'organisation de sa structure lui permet de résister aux forces mécaniques extérieures (force de compression (GPa) : 0.15 -0.40 et Module de Young (GPa) : 15.2 – 40.7) (Ratner et al. 1996). L'os compact est constitué de lamelles circonférentielles bordant le périoste et de lamelles cylindriques formant l'ostéon, ou système de Havers (Figure 2.2). Les lamelles sont séparées par des jonctions appelées lacunes où résident des cellules ostéoformatrices matures, appelées ostéocytes. Chaque ostéon renferme un canal de Havers permettant le passage des nerfs et des vaisseaux sanguins. Des canaux très fins, appelés canalicules, permettent la communication entre les lacunes et le canal de Havers (Clarke 2008). C'est grâce à ces réseaux de canaux et canalicules que l'évacuation des déchets et l'approvisionnement en nutriments des ostéocytes est possible au sein des ostéons de l'os compact (Piekarski & Munro 1977; Fritton & Weinbaum 2009).

Situé entre l'os compact et la cavité médullaire, l'os spongieux correspond à la partie poreuse du tissu osseux (30 à 90 % de porosité), renfermant les vaisseaux sanguins et la moelle osseuse (André et al. 2008). Sa structure en forme d'éponge est constituée de trabécules osseuses entrecroisées, qui permettent à l'os de résister à des forces venant de toutes directions (Figure 2.1 et 2.2). En cas d'ostéoporose, les trabécules se raréfient fragilisant la structure osseuse qui devient plus sensible aux fractures (Marieb & Hoehn 2015).

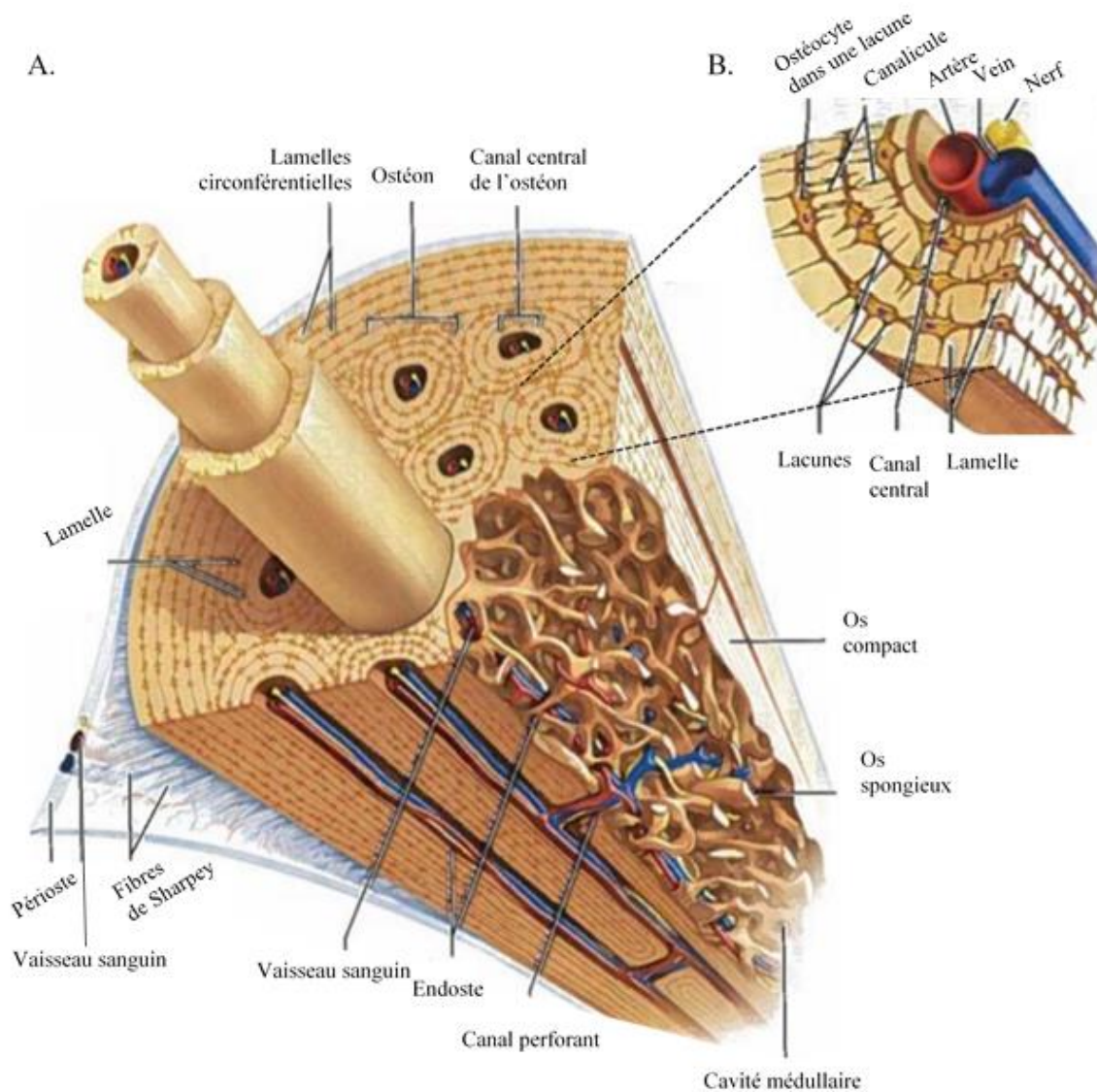


Figure 2.2 - Structure de l'os compact (A) et de l'ostéon (B) (reproduction autorisée: Marieb & Hoehn 2015)

2.1.1.1.2 Description des différents types de cellules osseuses

Le tissu osseux contient quatre types principaux de cellules différenciées pouvant être séparés en deux catégories (Marieb & Hoehn 2015). Celle regroupant les cellules ostéoformatrices, composée d'ostéoblastes, d'ostéocytes et de cellules bordantes, et la seconde catégorie composée des cellules ostéorésorbantes ou ostéoclastes.

Les **cellules ostéoformatrices** proviennent toutes de la différenciation de cellules ostéoprogénitrices, appelées aussi cellules souches mésenchymateuses (MSCs) (Figure 2.3). Ces MSCs peuvent résider dans les couches fibreuses internes du périoste et de l'endoste. Elles

sont multipotentes, c'est-à-dire qu'elles sont capables de se différencier en plusieurs lignées cellulaires : ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes (Dominici et al. 2006). La différenciation ostéoblastique des MSCs est contrôlée par des stimuli mécaniques et/ou biochimiques (cytokines, hormones, vitamines, facteurs de croissance) qui seront décrits de manière plus détaillée dans la section 2.1.3.2 (Einhorn & Gerstenfeld 2015).

Les **ostéoblastes** sont responsables de la sécrétion des protéines de la matrice osseuse organique (ostéoïde) et de sa minéralisation. L'ostéoïde est riche en collagène (type I et IV) et autres protéines [ostéocalcine (OC), ostéopontine (OPN), sialoprotéine osseuse (BSP)] liant le calcium et permettant d'initier la minéralisation de la matrice (Toppets et al. 2004). Les ostéoblastes synthétisent également une enzyme contenue dans leurs vésicules, la phosphatase alcaline (ALP), qui permet l'accumulation d'ions calcium (Ca^{2+}) et phosphate (PO_4^{3-}) nécessaire à la minéralisation de la matrice. Ce phénomène sera détaillé dans la section 2.1.1.1.3. Afin de leur permettre de telles synthèses protéiques, le cytoplasme des ostéoblastes est riche en réticulum endoplasmique bien développés et en appareils de Golgi volumineux (Manolagas 2000). Les ostéoblastes ont une durée de vie qui peut varier d'une à dix semaines et finissent par se transformer en ostéocytes lorsqu'ils sont emprisonnés dans la matrice osseuse, ou en cellules bordantes lorsqu'ils entrent dans un état de repos à la surface du tissu osseux. Les ostéoblastes peuvent aussi mourir par apoptose (Katsimbri 2017).

Les **ostéocytes** constituent le stade terminal de différenciation de la lignée ostéoblastique (Figure 2.3). Ils ont une demi-vie d'environ 25 ans (Knothe-Tate et al. 2004). Ils sont incapables de se diviser et sont emprisonnés dans les lacunes de la matrice extracellulaire (ECM) minéralisée. Par l'intermédiaire de prolongements cellulaires, ils s'étendent à l'intérieur de très fins canaux alliant les lacunes (les canalicules) et sont reliés entre eux ainsi qu'avec les autres cellules osseuses par des jonctions communicantes (Civitelli 2008). Leur participation à la synthèse de la ECM est limitée et ils ont un corps cellulaire plus petit et moins développé que les ostéoblastes (Marieb & Hoehn 2015). Toutefois, ils participent à l'entretien de la ECM et régulent son remodelage en détectant les tensions et stimuli mécaniques afin de transmettre l'information aux cellules synthétisant (ostéoblastes) ou résorbant (ostéoclastes) la matrice osseuse. Ils contrôlent ainsi le maintien de l'homéostasie calcique (Katsimbri 2017).

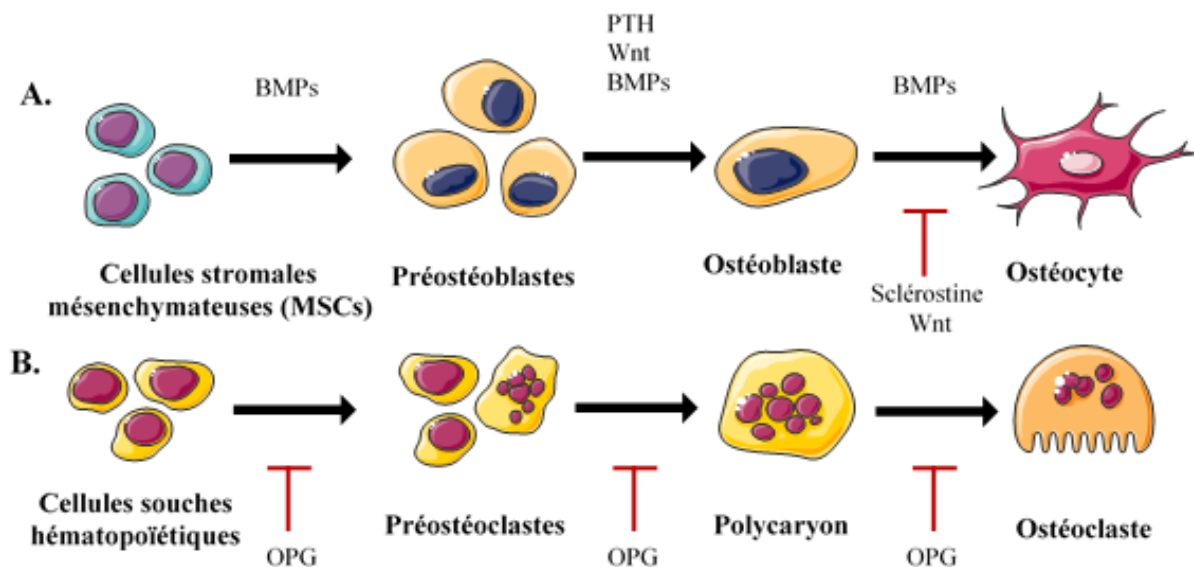


Figure 2.3 - Différenciation des lignées ostéoformatrice (A) et ostéorésorbante (B) (Adapté de Drevelle, 2013; Einhorn et Gerstenfeld, 2015; Servier Medical Art)

Les **cellules bordantes** de forme aplatie et allongée sont retrouvées à la surface interne et externe du tissu osseux (Marieb & Hoehn 2015). Dans un stade de repos, elles communiquent toutefois avec les autres types cellulaires pour coordonner la formation et la résorption du remodelage osseux (Everts et al. 2002).

Contrairement aux autres cellules osseuses, les **ostéoclastes** appartiennent à la lignée des monocytes-macrophages et proviennent des cellules souches hématopoïétiques (Bruzzaniti & Baron 2006). L'activation et le maintien de l'ostéoclastogénèse se fait par l'intermédiaire de facteurs solubles comme la cytokine *macrophage-colony stimulating factor* (M-CSF) qui se lie à son récepteur (c-fms) et la cytokine *receptor activator of nuclear factor kappa β ligand* (RANKL) qui se lie à son récepteur RANK (Figure 2.4). Suite à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques en préostéoclastes, ils fusionnent pour donner des polycaryons, larges cellules (50 à 100 microns de diamètre) multinucléées (Boyle et al. 2003). Ces dernières se différencient en ostéoclastes matures et développent un appareil lysosomal permettant la libération de protons (hydrolyse de la ECM inorganique) et d'enzymes hydrolases (hydrolyse de la ECM organique) responsables de la résorption de la ECM osseuse. Ils ont une durée de vie d'environ 2 semaines (Manolagas 2000).

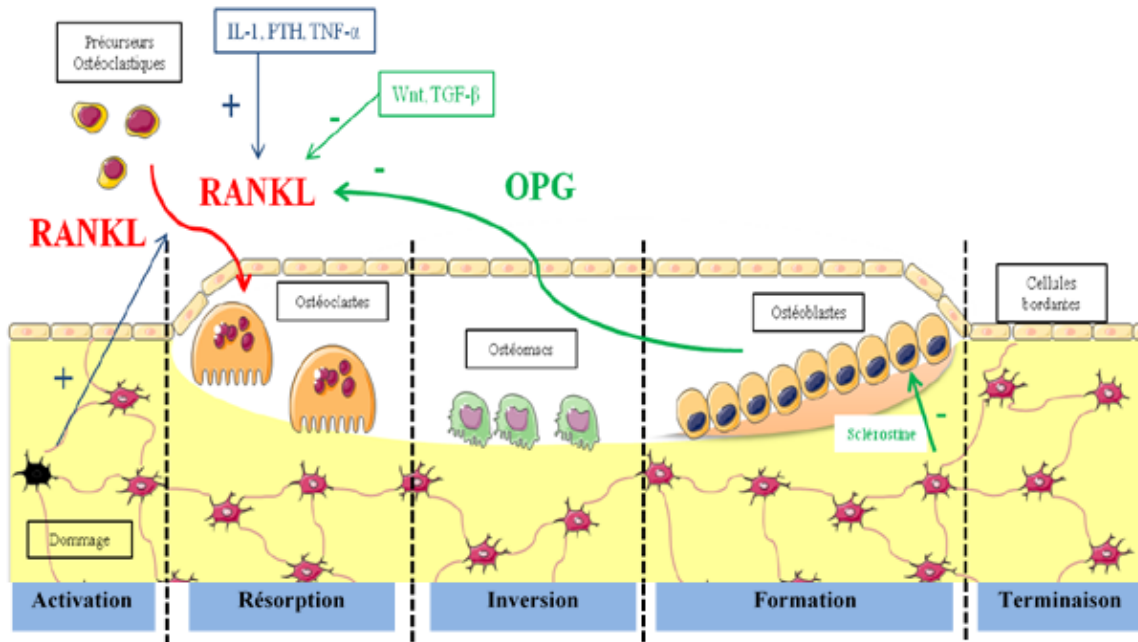


Figure 2.4 - Cycle du remodelage osseux (reproduction autorisée: Drevelle & Fauchaux 2013)

2.1.1.1.3 Remodelage osseux

Le tissu osseux est un tissu dynamique qui est perpétuellement renouvelé (5 à 7% de la masse osseuse/ semaine) en alternant les phénomènes de résorption et de formation osseuse (Katsimbri 2017). Chaque année, en moyenne 5% de l'os cortical et 20% de l'os trabéculaire sont remaniés (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al. 2006). Ce renouvellement permet de maintenir l'homéostasie calcique sanguine par l'intermédiaire de plusieurs hormones, tel que l'hormone parathyroïdienne (PTH) (Katsimbri 2017). Il réduit les risques de fractures, souvent causés par des cristaux de calcium devenus friables, en s'adaptant aux nouvelles contraintes mécaniques appliquées sur l'os (Katsimbri 2017). Des groupes d'ostéoblastes et d'ostéoclastes adjacents, formant des unités de remaniement osseux (BRUs), interviennent en association dans le processus de remodelage (Figure 2.4) (Raggatt & Partridge 2010). La **phase d'activation** de ce processus mène à la **phase de résorption** du tissu osseux qui dure quelques semaines. S'en suit une **phase d'inversion** du mécanisme, aboutissant à une **phase de formation** d'une nouvelle masse osseuse d'une durée de quelques mois. Les BRUs agissent à la fois aux surfaces interne et externe du tissu (Clarke 2008).

Phase d'activation

Les cellules bordantes, recouvrant la surface du tissu osseux, empêchent l'accès des ostéoclastes à la ECM. La phase d'activation débute lors du rétrécissement des cellules bordantes sous l'action de différents facteurs comme la PTH, la vitamine D3 et la prostaglandine E2 (PGE2) (Toppets et al. 2004). Des préostéoclastes sont alors recrutés et ils se différencient en ostéoclastes matures à la surface du tissu osseux.

Phase de résorption du tissu osseux

Les ostéoclastes sont capables de se déplacer à la surface de l'os afin d'atteindre les zones de résorption (Figure 2.5)(Väänänen 2005).

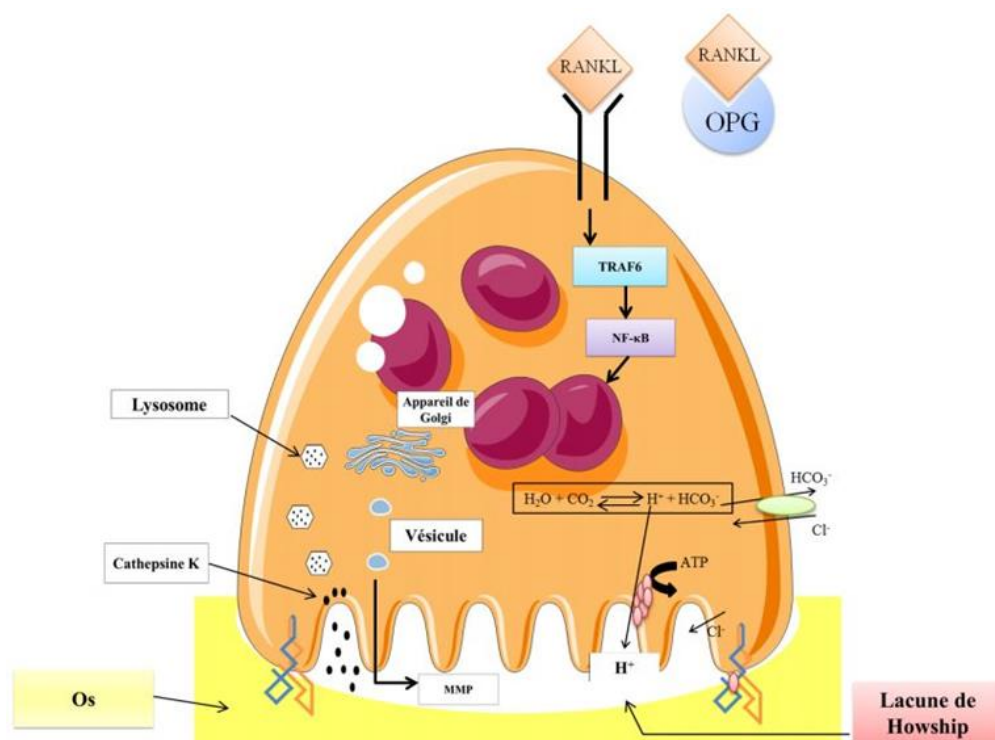


Figure 2.5 - Structure et fonctionnement d'un ostéoclaste pendant le remodelage osseux (Drevelle 2013)

Lors de leur activation, les ostéoclastes développent une bordure en brosse au contact de la surface osseuse. Ils adhèrent étroitement à la matrice osseuse et forment une zone de destruction. Dès lors, leur bordure en brosse se dépolarise par l'action de pompes ATPase à protons H^+ qui acidifient le milieu extracellulaire (Eriksen 2010). Des enzymes hydrolases lysosomiales sont également libérées comme les métalloprotéases matricielles (MMP), la cathepsine K, ou la *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP) (Eriksen 2010; Boyce et al.

2009). Ils dégradent ainsi le calcium de la ECM osseuse et forment des sillons appelés lacunes de Howship (Eriksen 2010).

Phase d'inversion

Une fois la résorption terminée, sous l'effet de la calcitonine sécrétée par les cellules C de la thyroïde, les ostéoclastes reçoivent un signal inhibiteur, leurs prolongements dendritiques se rétractent et ils meurent par apoptose (Copp & Cheney 1962; Keller et al. 2014). La sécrétion d'une cytokine *transformant growth factor-β* (TGF- β) par les ostéocytes en réponse aux estrogènes, inhiberait aussi l'activité résorbante des ostéoclastes (Heino et al. 2002). Les macrophages (ostéomacs) nettoient ensuite la lacune de Howship des débris cellulaires et tissulaires.

Phase de formation du tissu osseux

Des préostéoblastes sont alors mobilisés au niveau du front d'ossification et se différencient en ostéoblastes matures qui synthétisent la nouvelle ECM pour combler la lacune (Martin & Sims 2005; Capulli et al. 2014). Cette matrice non-minéralisée, ou ostéoïde, est composée de collagène, de protéoglycanes (PG) ou d'autres protéines non-collagéniques (Capulli et al. 2014). Les ostéoblastes libèrent par exocytose des vésicules riches en ALP qui hydrolysent les esters phosphoriques, inhibiteurs de la minéralisation (Capulli et al. 2014; Millan 2013). Cette enzyme ALP induit alors l'accumulation local d'ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} indispensables à la minéralisation de la matrice (Millan 2013). L'OC permet également d'augmenter la concentration locale d'ions Ca^{2+} et de les fixer sur la ECM non minéralisée (Toppets et al. 2004). Lorsque la concentration de Ca^{2+} et PO_4^{3-} dépasse la limite de solubilité à la surface de la matrice osseuse, des cristaux d'hydroxyapatite se forment spontanément (Capulli et al. 2014). Ces cristaux se placent par la suite entre les fibrilles de collagène, participant aux propriétés biomécaniques de la nouvelle matrice osseuse minéralisée (Capulli et al. 2014; Gelse et al. 2003).

2.1.1.2 *Réparation osseuse*

2.1.1.2.1 *Types de réparation osseuse*

Au début du développement de l'embryon humain, son squelette est formé uniquement de membranes fibreuses et de cartilage hyalin (articulaire) (Marieb & Hoehn 2015). Après la huitième semaine, ces structures sont progressivement remplacées par le tissu osseux. Ce processus d'ossification peut être de deux types. L'**ossification intramembraneuse** qui se produit dans la plupart des os plats (crâne, omoplate) et qui désigne le processus de formation d'un os à partir d'une membrane fibreuse. Il intervient également dans la consolidation des fractures bénignes. La quasi-totalité des autres os du squelette se forme par **ossification endochondrale** à partir du cartilage hyalin (Horton 1990).

Suite à une fracture, le processus de réparation osseuse post-natale est similaire à l'ossification embryonnaire (Einhorn & Gerstenfeld 2015). Cependant, le traumatisme physiologique engendré suite à la blessure permet l'intervention du système immunitaire, qui joue un rôle très important dans les premiers stades de guérison de la fracture (Einhorn & Gerstenfeld 2015).

2.1.1.2.2 *Stades, processus biologiques et mécanismes inducteurs dans la réparation osseuse*

Le processus de réparation osseuse intervenant lors d'une fracture dépend de l'âge du patient, du site et de l'importance de la blessure (Gibon et al. 2017). Les fractures osseuses survenant avant l'âge adulte sont causées principalement par des traumatismes dus à la pratique d'activités physiques ou des accidents violents (Marieb & Hoehn 2015). Cependant, la majorité des personnes âgées ont des os amincis et fragilisés, occasionnés par un déséquilibre homéostatique entraînant la dégénérescence du tissu osseux ou ostéoporose. Les fractures bénignes, dans lesquelles les fragments d'os gardent une position normale et une stabilité mécanique, sont consolidées par ossification intramembraneuse. Les fractures d'une plus grande importance requièrent à la fois une consolidation intramembraneuse et une formation osseuse endochondrale (Einhorn & Gerstenfeld 2015).

2.1.1.2.2.1 Stades et processus biologiques de la réparation osseuse

Formation d'un hématome

Lors d'une fracture, les vaisseaux sanguins présents à l'intérieur de l'os, du périoste et/ou dans les tissus voisins se rompent, provoquant une hémorragie (Marieb & Hoehn 2015). La réponse inflammatoire est immédiatement activée, ce qui permet au sang de coaguler et de former un hématome (Einhorn & Gerstenfeld 2015). Dans les premiers temps suivant la fracture, des cellules du système immunitaire (les macrophages, les monocytes, les neutrophiles, les lymphocytes B et T) puis les cellules souches de la moelle osseuse (MSCs et cellules hématopoïétique) sont recrutées au site de lésion (Einhorn & Gerstenfeld 2015). Les macrophages recrutés initialement servent à nettoyer le site de lésion des cellules ou tissus endommagés.

Formation du cal fibrocartilagineux

Plusieurs types cellulaires interviennent à ce stade de la cicatrisation pour former un tissu reconstitué appelé le **cal fibrocartilagineux**, permettant le maintien de l'os fracturé. Des fibroblastes provenant des tissus voisins, pénètrent au site de la fracture et produisent des fibres de collagène reliant les deux extrémités de la lésion (Marieb & Hoehn 2015). Des capillaires s'infiltrèrent dans l'hématome pour permettre l'approvisionnement des tissus environnants (Ai-Aql et al. 2008). Le périoste, membrane externe de l'os, joue un rôle essentiel à ce stade de la cicatrisation puisqu'il fournit les précurseurs des chondrocytes qui se déplacent jusqu'au site de lésion (Colnot 2009; Colnot et al. 2006). Sous l'influence de certaines cytokines (BMP-2 et TGF- β 3), ces dernières se différencient en chondrocytes matures et synthétisent la matrice cartilagineuse qui finit par se calcifier (Marieb & Hoehn 2015; Ozaki et al. 2000; Yu et al. 2010; Shen et al. 2009).

Formation d'un cal osseux

Cette étape de la consolidation correspond au passage d'un cal fibrocartilagineux à un **cal osseux**. Ce processus débute par l'hypertrophie des chondrocytes présents au site de lésion, qui s'élargissent progressivement, meurent par apoptose, et libèrent leur contenu dans le milieu extracellulaire (Ai-Aql et al. 2008). Les facteurs solubles produits pendant l'expansion des vaisseaux sanguins dans le tissu cartilagineux permettent l'induction apoptotique des chondrocytes (*vascular endothelial growth factor* (VEGF)), la migration et la prolifération des ostéoblastes (*platelet-derived growth factor* (PDGF)), et le recrutement des ostéoclastes (PDGF)

(Ai-Aql et al. 2008). Plusieurs facteurs tels que M-CSF et RANKL régulent l'ostéoclastogénèse, permettant la formation d'ostéoclastes matures qui résorbent le cartilage calcifié (Feng & Teitelbaum 2013). Ces cytokines jouent également un rôle pour recruter les MSCs qui prolifèrent et se différencient en ostéoblastes matures pour former une matrice osseuse immature (Marsell & Einhorn 2011). Cette matrice est mécaniquement instable et est composée d'un réseau irrégulier de fibres de collagène.

Remodelage

Enfin, la dernière étape de la cicatrisation osseuse est le remodelage osseux, détaillé dans la section 2.1.1.1.3. Ce remodelage, orchestré par une collaboration étroite entre les cellules précurseurs, les ostéoclastes, les ostéoblastes et les ostéocytes, aboutit à la réorganisation, à la synthèse et à la minéralisation d'une matrice osseuse semblable à l'os normal non fracturé et résistante aux mêmes sollicitations mécaniques (Marieb & Hoehn 2015).

2.1.1.2.2.2 Mécanismes moléculaires dans la réparation osseuse

De nombreuses cytokines, facteurs de croissance et vitamines interviennent dans les phases de la réparation osseuse (Figure 2.6). Les macrophages, les cellules inflammatoires et les cellules mésenchymateuses sécrètent des cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines -1 et -6 (IL-1 et IL-6), et le *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) jouant un rôle prédominant pour initier la réparation osseuse en permettant le recrutement de cellules inflammatoires par chimiotactisme (Marsell & Einhorn 2011; Einhorn & Gerstenfeld 2015). L'expression du TNF- α est accrue dans les 24 premières heures qui suivent la fracture, puis diminue progressivement pour devenir presque indétectable à 3 jours (Gerstenfeld et al. 2003). Le TNF- α joue également un rôle très important en initiant l'apoptose des chondrocytes hypertrophiques (Gerstenfeld et al. 2003). L'IL-6 intervient également dans les autres phases de la réparation osseuse en stimulant l'angiogenèse, la production de VEGF et la maturation des ostéoblastes et ostéoclastes (Yang et al. 2007). Dans les premiers temps suivant la fracture, la production de prostaglandine E2 est accentuée au site de fracture pour permettre également le recrutement de lymphocytes T (Dekel et al. 1981).

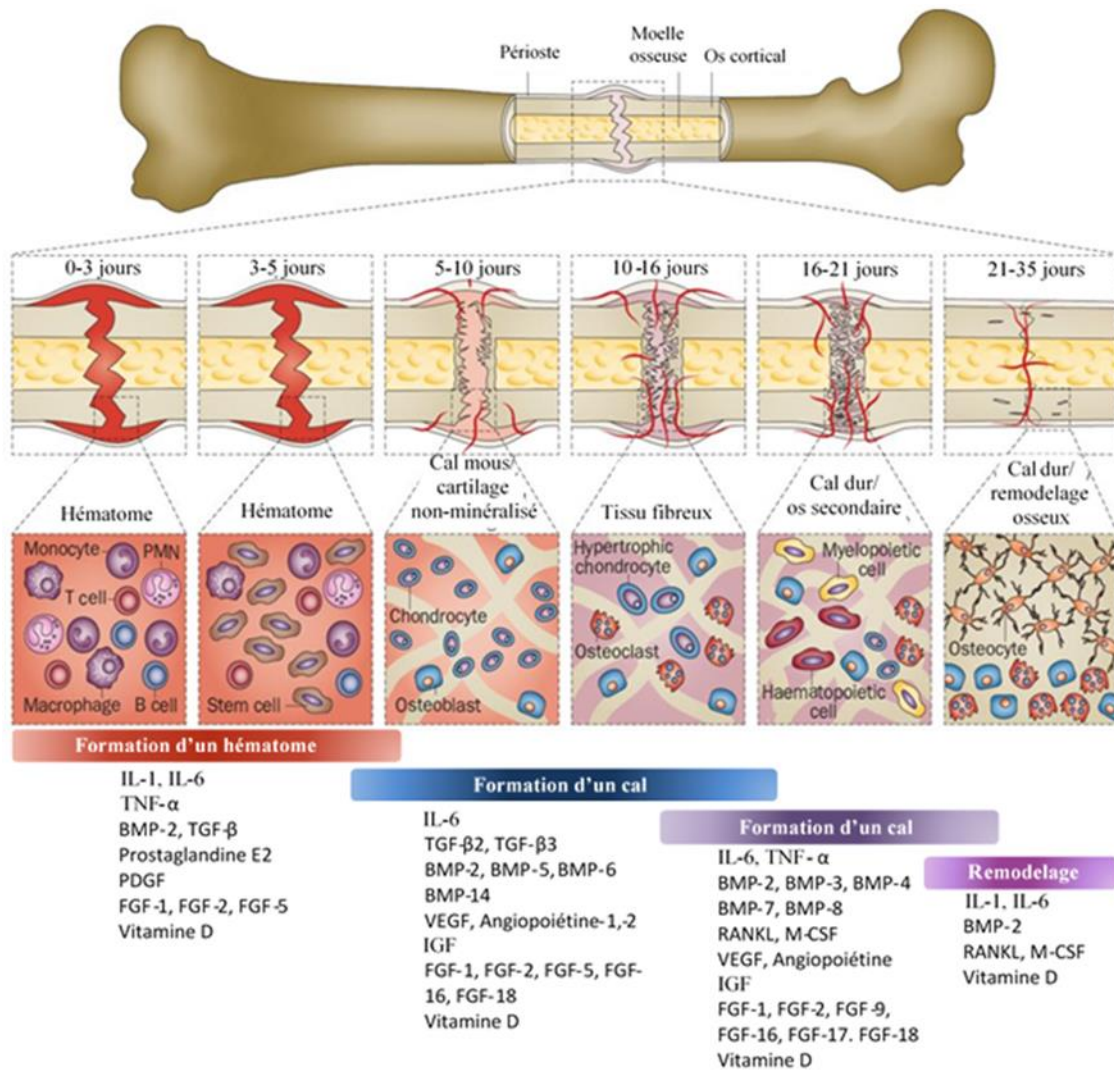


Figure 2.6 - Les phases de la réparation osseuse (Adapté de Beauvais, et al., 2016; Einhorn et Gerstenfeld, 2015; Lauzon et al., 2012)

Les facteurs angiogéniques régulent à la fois la vascularisation du cal osseux et la formation d'une matrice osseuse dense et minéralisée. Les VEGFs synthétisés par les ostéoblastes jouent un rôle central dans la régulation de l'angiogénèse et sont exprimés principalement à la fin de la formation du cal fibrocartilagineux (Ai-Aql et al. 2008). Les angiopoïétines -1 et 2 impliquées dans l'élargissement des vaisseaux sanguins et le développement de vaisseaux latéraux interviennent dès les étapes primaires de la réparation osseuse (Ai-Aql et al. 2008).

De très nombreuses cytokines et facteurs de croissance tels que les BMP, TGF- β , GDF, *fibroblast growth factor* (FGF), *insuline-like growth factor* (IGF), EFG, VEGF et PDGF,

interviennent tout au long de la consolidation osseuse (Ai-Aql et al. 2008). Leurs rôles au sein du tissu osseux seront détaillés dans les sections suivantes.

2.1.1.2.2.1 *Contacts cellules-cellules*

Les cellules d'un même tissu sont reliées entre elles par différents types de jonctions telles que les jonctions serrées, les jonctions adhérentes, les desmosomes et les jonctions communicantes (Figure 2.6) (Bouet et al. 2015). Ce dernier type de jonctions est composé de canaux (les connexons) formés de six connexines qui permettent le passage de signaux chimiques tel que les ions (Ca^{2+} , Na^+ , K^+), les seconds messagers (AMPc) et d'autres petites molécules (glucose) et ainsi la communication entre les cellules (Mese et al. 2007). Ces jonctions sont retrouvées dans de nombreux tissus du corps humain.

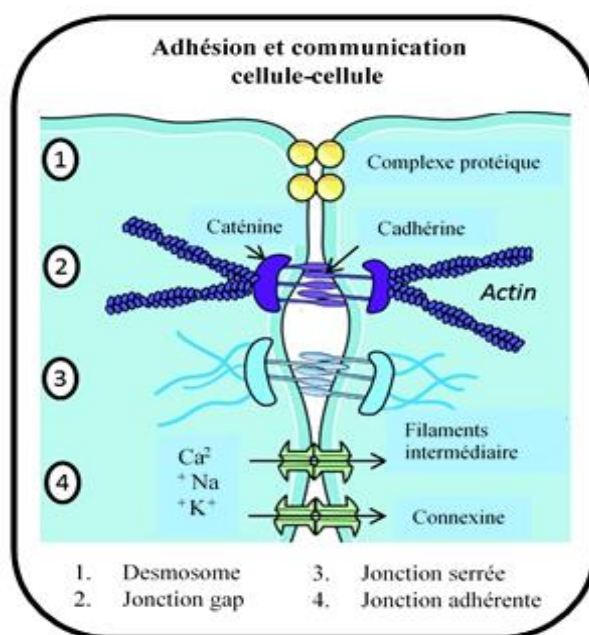


Figure 2.7 - Adhésion et communication intercellulaire (reproduction autorisée: Bouet et al. 2015)

2.1.2 Facteurs matriciels influençant la réparation osseuse

2.1.2.1 *Matrice extracellulaire*

La ECM est l'ensemble des constituants fibrillaires et minéraux de l'os divisés en une matrice inorganique (65% de la masse osseuse) et une matrice organique (35% de la masse osseuse) (Kumar et al. 2005).

2.1.2.1.1 *Matrice inorganique*

La partie inorganique de la matrice osseuse est composée essentiellement de cristaux d'hydroxyapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) qui confèrent à l'os sa rigidité et sa dureté lui permettant par exemple de résister aux contraintes par compression (Kumar et al. 2005). Ils sont formés dans des vésicules extracellulaires, produites par les ostéoblastes et les chondrocytes, où s'accumulent progressivement le calcium et le phosphate environnant (Anderson 2003). La formation des cristaux d'hydroxyapatite débute par la nucléation des ions Ca^{2+} et PO_4^{3-} , ayant atteint un seuil de saturation dans les vésicules. Ces cristaux croissent progressivement jusqu'à rompre la membrane de la vésicule et se retrouver dans le milieu extracellulaire (Anderson 2003). La matrice inorganique contient également d'autres ions comme du sodium, du magnésium, du manganèse et du fluorure (Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil et al. 2006).

2.1.2.1.2 *Matrice organique*

La partie organique de la matrice osseuse est composée principalement de fibres de collagène de type I et d'autres protéines non-collagène telles que la fibronectine, l'ostéonectine et l'OC (Tableau 2.1) pouvant servir à l'adhésion cellulaire, à la liaison du calcium ou à induire la minéralisation (Kumar et al. 2005). La matrice osseuse organique contient également des enzymes, des cytokines et des facteurs de croissance qui jouent un rôle primordial dans la régulation du remodelage osseux et dans la minéralisation.

Près de 90% du poids sec de la matrice osseuse organique est formé de fibrilles (15 à 500 nm de diamètre) de collagène de type I (Marieb & Hoehn 2015; Gurry et al. 2010). Ces fibrilles s'organisent en fibres de collagène participant ainsi aux propriétés mécaniques de l'os (augmentation de la résistance aux déformations, diminution des probabilités de fractures) (Gautieri et al. 2011).

La matrice extracellulaire osseuse est également constituée de PG, glycoprotéines auxquelles sont rattachées des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) (Salbach et al. 2012). Les GAG, polymères de disaccharide, principalement retrouvés dans l'os sont la chondroïtine sulfate (CS) et l'acide hyaluronique (HA). CS peut être rattaché à un cœur protéique pour former des PG appartenant à la famille des *small leucine-rich proteoglycans* (SLRP) (Bertassoni & Swain 2014). La décorine et le biglycane sont les SLRP les plus présents dans la matrice extracellulaire osseuse et sont étroitement associés aux fibres de collagène de type I. Ces

dernières participent à la régulation des pressions osmotiques et hydrostatiques de la matrice dans le système osseux (Bertassoni & Swain 2014). La décorine est particulièrement impliquée dans le processus de fibrillogenèse du collagène, influençant ainsi la minéralisation de la matrice (Kalamajski & Oldberg 2010). Les SLRP sont capables de se lier sur de multiples récepteurs cellulaires, facteurs de croissance (TGF- β), cytokines (Il-1, Il-6) et autres composantes de la ECM (fibronectine) influençant ainsi la fonction des cellules osseuses (Schaefer & Iozzo 2008; Bidanset et al. 1992). Ainsi, ils modulent l'activation de voies de signalisation responsables de la migration, prolifération et de la fonction des cellules de la ECM osseuse (Tableau 2.1) (Ni et al. 2014; Bi et al. 2005; Inkson et al. 2009; Bertassoni & Swain 2014).

Des protéines contenant l'acide γ -carboxyglutamique (Gla), résultant d'une carboxylation post-traductionnelle des résidus de glutamate dans le réticulum endoplasmique, sont présentes dans le tissu osseux (Price et al. 1976; Zoch et al. 2016). La plus abondante est l'OC, sécrétée principalement par les ostéoblastes dans la ECM (Hauschka & Wians 1989). Elle joue un rôle local sur le système osseux et systémique en agissant comme une hormone (Zoch et al. 2016). Au niveau du système osseux, l'OC initialise la formation de cristaux d'hydroxyapatite et inhibe la minéralisation après l'atteinte d'un seuil de saturation en sel (Price et al. 1976; Zoch et al. 2016). Par l'intermédiaire de l'OP, l'OC fait la liaison entre la matrice organique (fibres de collagène) et la matrice inorganique (cristaux d'hydroxyapatites) de l'os (Ritter et al. 1992; Hoang et al. 2003; Zoch et al. 2016). D'autre part, l'OC régule le métabolisme du glucose humain en agissant sur la prolifération des cellules- β du pancréas, responsables de la production d'insuline (Lee et al. 2007; Zoch et al. 2016; Ferron et al. 2008). Elle aurait aussi un impact sur plusieurs autres organes du corps humain. Elle stimulerait la production de testostérone dans les testicules et de neurotransmetteurs au niveau du cerveau, et augmenterait la sensibilité à l'insuline des tissus musculaires et adipeux (Patterson-Buckendahl et al. 2012; Zoch et al. 2016; Oury et al. 2013; Karsenty & Oury 2014).

Tableau 2.1 - Les protéines non collagène de la matrice extracellulaire osseuse (Drevelle 2013)

Protéines	Masse moléculaire et modifications post-traductionnelles	Effet sur les ostéoblastes	Effets sur les ostéoclastes	Références
Protéoglycanes des SLRP (Small leucine-rich proteoglycans)				
Biglycane	-200-350 kDa -Coeur protéique riche en leucine (45 kDa) avec deux chaînes courtes de glycosaminoglycanes (GAG) chondroïtine/dermatane sulfates	↑ Différenciation ↑ Minéralisation	↑ Ostéoclastogénèse due à des ostéoblastes non fonctionnels	Bi et al., 2006
Décorine	- 90-140 kDa - Coeur protéique riche en leucine (40 kDa) avec une chaîne GAG chondroïtine sulfate/dermatane sulfates	↓ Minéralisation en modulant l'assemblage du collagène		Mochida et al. 2009
Protéine contenant du γ -carboxyglutamique				
Ostéocalcine (OC)	- 49 acides aminés (5-8 kDa) - Carboxylation des 3 acides γ -carboxyglutamique (Gla) dépend de la vitamine K (OC porcine) - Structure stabilisée par des ponts disulfure Cys23-Cys29 - Protéine chargée négativement en surface capable de chélater 5 ions calcium	↓ Minéralisation	↑ Différenciation et maturation des précurseurs des ostéoclastes par des peptides extraits de l'OC	Grafeneau et al. 2000; Hoang et al. 2003; Lee et al. 2000; Ishida et Amano, 2004
Protéines SIBLING (Small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein)				
Ostéopontine (OP)	-301 acides aminés (rat) - Modifications post-traductionnelles (phosphorylation sur la sérine, O/N-glycosylation) induisant un poids moléculaire de 60 kDa - Motif d'interaction cellulaire: RGD	↑ Adhésion ↑ Différenciation	↑ Adhésion ↑ Résorption osseuse	Sodek et al. 2002; Alford et Hankenson, 2006; Qin et al. 2004
Sialoprotéine osseuse (BSP)	- 327 acides aminés (33-34 kDa) - Modifications post-traductionnelles (phosphorylation Ser/Thr, sulfatation tyrosine, N/O- glycosylation) augmentation du poids moléculaire de la BSP à 75 kDa - Motif d'interaction cellulaire: RGD	↑ Adhésion ↑ Minéralisation	↑ Adhésion ↑ Différenciation ↑ Résorption osseuse	Alford et Hankenson, 2006; Valverde et al. 2005; Yang et al. 2010
Protéines d'adhésion				
Fibronectine	- 2 sous-unités de 235-250 kDa liées par 2 liaisons disulfide - 3 types d'unité: 12 types I répétés, 2 types II répétés et 15-17 types III répétés - Motif d'interaction cellulaire : RGD localisé sur la répétition III10 et son site synergique PHSRN localisé sur la répétition III9	↑ Adhésion ↑ Survie ↑ Prolifération ↑ Différenciation ↑ Minéralisation	↓ Ostéoclastogénèse ↑ Résorption osseuse	Pankov et Yamada, 2002; Gramoun et al. 2010
Thrombospondine	- 120-150 kDa - Motif d'interaction cellulaire: RGD	↑ Différenciation	↑ Résorption cellulaire	Alford et Hankenson, 2006

De nombreuses protéines non-collagène appartenant à la famille des *small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins* (SIBLING) sont retrouvées dans cette matrice (Fisher & Fedarko 2003). L'OP, la BSP et la *matrix extracellular phosphoglycoprotein* (MEPE) font partie des SIBLING et partagent des caractéristiques génétiques et biochimiques communes. Les gènes codant pour ces protéines présentent des structures d'exons similaires et sont localisés à proximité sur le chromosome humain (4q21) et murin (5q) (Fisher & Fedarko 2003; Staines et al. 2012). Ces glycoprotéines subissent toutes des modifications post-transcriptionnelles similaires (O/N-glycosylation, phosphorylation et/ou sulfatation) influençant leurs rôles dans le système osseux (Staines et al. 2012). Elles permettent l'adhésion des cellules osseuses et régulent le remodelage et la minéralisation de la matrice extracellulaire, par l'intermédiaire des motifs Arg-Gly-Asp (RGD) et *acidic serine-rich and aspartate-rich motif* (ASARM) (Tableau 2.1) (Marquis et al. 2009; Drevelle & Faucheu 2013; Alford et al. 2015; Staines et al. 2012).

La ECM osseuse contient d'autres protéines d'adhésion contenant le motif RGD, telles que la fibronectine et la vitronectine, qui interagissent avec les cellules osseuses par l'intermédiaire de protéines transmembranaires spécifiques appelées intégrines (Graham et al. 2010). Toutefois, la fibronectine permet une meilleure adhésion et différenciation ostéoblastique des MSCs humaines comparativement à la vitronectine (Schwab et al. 2013). Ces protéines d'adhésion ne reconnaissent pas les mêmes sous-unités d'intégrine exprimées à la surface des MSCs, pouvant ainsi expliquer les résultats observés.

2.1.2.1.3 Intégrines

Les intégrines sont des récepteurs transmembranaires hétérodimériques composés d'une sous-unité α et une sous-unité β , liant spécifiquement des protéines de la ECM telles que le collagène, la fibronectine et la vitronectine (Hynes 2002). Elles permettent d'assurer l'adhésion des cellules à la ECM et d'activer la machinerie de signalisations intracellulaires subséquentes. Pour le moment, 24 intégrines ont été identifiées, chacune correspondant à l'appariement d'une des 18 sous-unités α avec une des 8 sous-unités β existantes (Hynes 2002). Le "*knock-out*" individuel des gènes codant pour ces sous-unités a révélé que chacune des 24 intégrines connues a une fonction spécifique non redondante (développement, réponse immunitaire, angiogenèse, remodelage osseux, etc...).

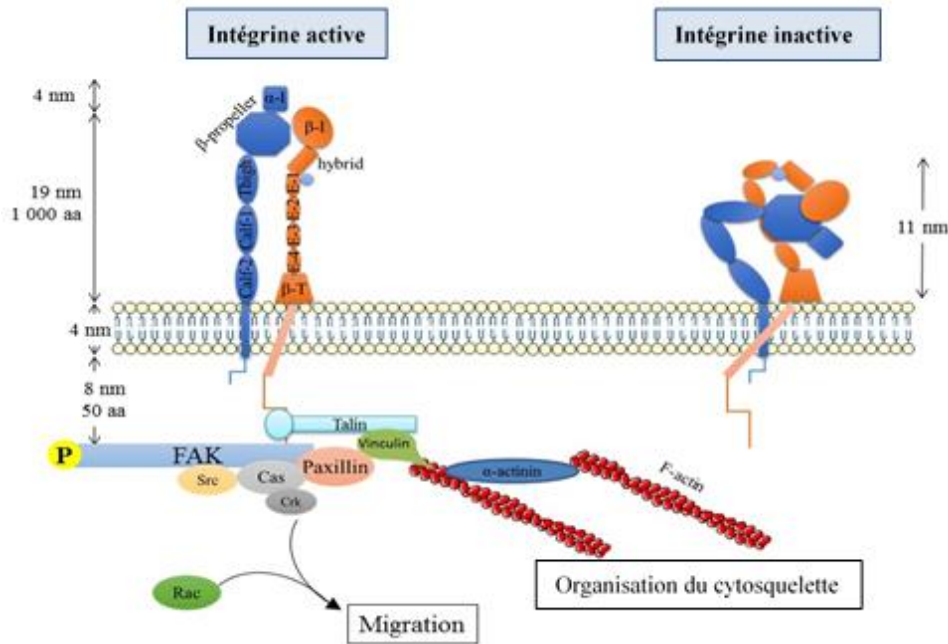


Figure 2.8 - Structure et activation d'une intégrine (Beauvais et al. 2016)

L'analyse de la structure de l'intégrine $\alpha\beta 3$ par rayons X a permis d'établir des similitudes et des différences entre les sous-unités α et β (Xiong et al. 2001). Chaque sous-unité possède une tête globulaire suivie d'un corps sous forme de tige traversant la membrane de la cellule et se terminant par une courte queue cytoplasmique (Figure 2.7). Ce domaine permet d'établir des connexions entre le cytosquelette de la cellule et les protéines du milieu extracellulaire, en activant plusieurs voies de signalisation intracellulaire (Hynes 2002). La sous-unité α a une longueur moyenne de 1000 acides aminés et possède 4 sous-domaines (β -propeller, thigh, calf-1, calf-2) (Xiong et al. 2001; Campbell & Humphries 2011).

L'interaction entre les surfaces des feuillets β - β -propeller et thigh - permet une rotation et un changement de conformation de l'intégrine induit par la présence d'ions Ca^{2+} (Campbell & Humphries 2011). La concentration en ions Ca^{2+} régule également les interactions entre le domaine β -propeller de la sous-unité α et le domaine A de la sous-unité β de l'intégrine (Xiong et al. 2004). La sous unité β est plus courte, environ 750 acides aminés, et est constituée de 7 sous-domaines. Un domaine β -I interagit à un domaine hybride, lui-même attaché à un domaine nommé *plexin-semaphorin integrin* (PSI). Ce dernier correspond à une suite de 4 modules *epidermal growth factor* (EGF) tous composés d'une suite de 8 résidus cystéine (Xiong et al.

2004). PSI est finalement relié à une *queue β* intégrée dans la membrane (Campbell & Humphries 2011).

Ces sous-unités α et β possèdent toutes deux une région flexible, permettant à l'intégrine de passer d'un état inactif à actif (Xiong et al. 2001). L'interaction de l'intégrine avec son ligand provoque un réarrangement structural permettant une meilleure liaison avec les protéines de la ECM. Ce mécanisme d'activation est médié par différents cations tels que le magnésium (Mg^{2+}), le calcium (Ca^{2+}) et le manganèse (Mn^{2+}) (Campbell & Humphries 2011). L'ion Mg^{2+} se lie directement sur un site de l'intégrine appelé *metal ion-dependent adhesion site* (MIDAS). L'ion Ca^{2+} joue différents rôles suivant son site de liaison sur l'intégrine (Campbell & Humphries 2011). Il peut se lier au site adjacent à MIDAS (ADMIDAS) avec une faible affinité et agit comme inhibiteur de l'activation de l'intégrine (Lee et al. 1995). Par contre, sa haute affinité avec le site *synergistic metal ion binding site* (SyMBS) permet de renforcer le signal émit, dans des conditions faibles en calcium (Chen et al. 2003). L'ion Mn^{2+} possède le même site de liaison ADMIDAS que le Ca^{2+} (Humphries et al. 2003). C'est le remplacement du Ca^{2+} au site ADMIDAS par le Mn^{2+} qui provoque un changement de conformation et une activation de l'intégrine (Humphries et al. 2003). Toutefois, le regroupement de plusieurs intégrines est nécessaire pour augmenter les interactions avec la ECM (Campbell & Humphries 2011). Ceci permet la formation de complexes protéiques cytoplasmiques au niveau de la membrane plasmique, témoin d'une adhérence cellulaire solide (Campbell & Humphries 2011).

2.1.2.2 *Adhésion et devenir des cellules osseuses*

2.1.2.2.1 *MSCs/Ostéoblastes/Ostéocytes*

Comme vue précédemment, les intégrines qui interagissent avec les protéines de la ECM possèdent une extrémité cytoplasmique. Cette dernière fait la liaison avec les protéines du cytosquelette (vinculine, filaments d'actine) et permet la transduction de signaux qui contrôle la morphologie, la migration, la survie et la différenciation cellulaire (Hynes 2002). L'intégrine ne possède pas d'activité enzymatique, ces signaux intracellulaires sont médiés par des enzymes comme la *focal adhesion kinase* (FAK), la *rous sarcoma oncogene cellular homolog* (Src) et la famille des RhoGTPases (Dubash et al. 2009; Huveneers & Danen 2009). La FAK est composée de 3 domaines : le *four-point-one*, *ezzrin*, *radixin*, *moesin* (FERM), un domaine kinase, et le *focal adhesion, targeting* (FAT) (Lal et al. 2009). Lorsque le site d'auto-inhibition du domaine FERM

est lié au domaine kinase, FAK est sous une forme inactive (Figure 2.8) (Frame et al. 2010). L'activation de FAK est permise par la liaison d'un ligand sur ce site auto-inhibiteur, permettant l'autophosphorylation de la Tyr 397 et la fixation de la protéine Src (Frame et al. 2010). Par la suite, la protéine Src est responsable de la phosphorylation de Tyr 576/577 (domaine kinase) et de Tyr 861/925 (domaine FAT), permettant à FAK de compléter son activation (Frame et al. 2010).

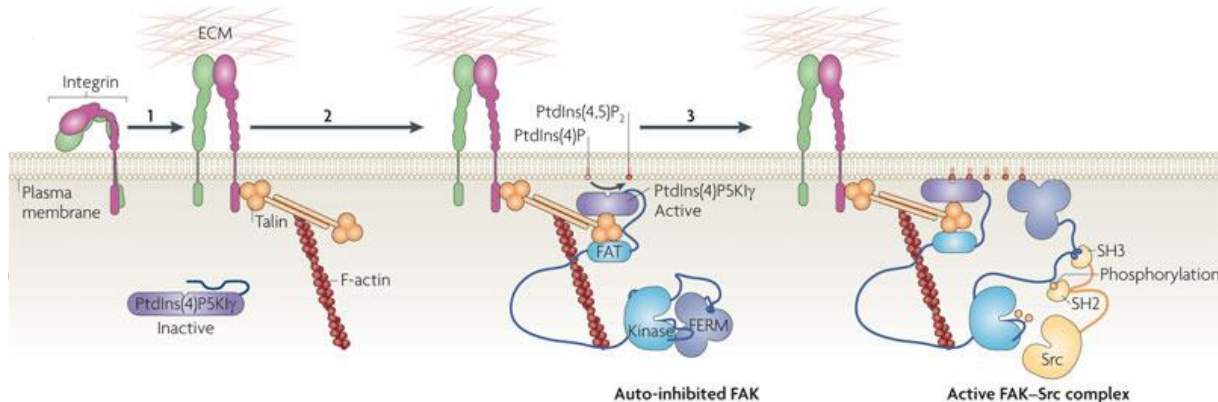


Figure 2.9 - Activation de la FAK (reproduction autorisée: Frame et al. 2010)

La connexion des intégrines avec le cytosquelette de la cellule est permise par la formation de complexes protéiques, appelés *integrin adhesion complexe* (IAC), composés de plus de 2400 éléments très dynamiques (Horton et al. 2015). L'adhésion cellulaire des ostéoblastes, médiée par les intégrines, peut prendre la forme de complexes focaux, de points focaux d'adhésion et d'adhésion fibrillaire (Zaidel-Bar et al. 2004). Les complexes focaux sont majoritairement composés de paxilline et de vinculine (Geiger et al. 2001). Par la suite, les RhoA peuvent stimuler la transformation de ces complexes en points focaux situés aux extrémités des filaments d'actine au niveau de la membrane plasmique des cellules (Valdembri & Serini 2012; Geiger et al. 2001). Les points focaux ou adhésomes sont constitués de près de 180 éléments regroupant des protéines structurales (taline et vinculine) et des protéines de signalisation (FAK et Src) (Geiger et al. 2001; Zaidel-Bar & Geiger 2010). Ce type d'adhésion est le témoin d'un bon ancrage des cellules à la ECM *via* les intégrines, médiant ainsi la transmission de signaux anti-apoptotique (Stupack et al. 2001). Les matériaux biomimétiques doivent donc promouvoir la formation de points focaux pour permettre aux cellules d'adhérer et de survivre sur cette matrice (Ruoslahti & Reed 1994).

Après avoir adhérees à la ECM, les MSCs débiteront leur différenciation en préostéoblastes, en ostéoblastes et finalement en ostéocytes (Figure 2.3) (Marquis et al. 2009; Einhorn & Gerstenfeld 2015). Cette différenciation peut être induite par des hormones, des cytokines ou encore des facteurs de croissance appelés protéines morphogénétiques osseuses (BMPs) (Einhorn & Gerstenfeld 2015).

2.1.2.2 *Ostéoclastes*

Tout comme les ostéoblastes, les ostéoclastes vont adhérer à la surface de l'os *via* plusieurs types d'intégrine dont la plus fréquente est $\alpha\beta3$ (Rodan & Rodan 1997). Suite à leur adhésion, les ostéoclastes réorganisent leur cytosquelette et forment des podosomes (Luxenburg et al. 2006; Schachtner et al. 2013). Ces derniers sont de petites structures d'adhésion indispensable pour la formation de zones étanches permettant aux ostéoclastes de se fixer fermement et de résorber la matrice osseuse minéralisée (Ory et al. 2008; Destaing 2003).

2.1.3 Facteurs de croissance et signalisation

Au cours de la réparation osseuse d'une fracture, par exemple, de nombreux facteurs influencent le devenir des cellules osseuses. Ils peuvent être systémiques (PTH, protéines Wnt) ou localisés au site de la fracture (cytokines, facteurs de croissance, BMPs). Ces facteurs induisent plusieurs voies de signalisation menant à l'expression de gènes spécifiques, pouvant être associée à des fonctions propres aux stades de différenciation des cellules osseuses. Ces gènes sont considérés comme des marqueurs ostéogéniques et sont nécessaires pour comprendre l'effet des facteurs solubles sur la différenciation osseuse.

2.1.3.1 *Les marqueurs ostéogéniques*

Les cellules osseuses responsables de la synthèse de l'ostéoïde et de sa minéralisation sont obtenues à partir de la différenciation ostéoblastique des MSCs. Les précurseurs de la lignée ostéoblastique acquièrent progressivement des propriétés leur permettant de mettre en place ces fonctions. L'analyse de l'expression des gènes codant pour les protéines responsables de ces fonctions permet de suivre l'évolution de chaque stade de différenciation cellulaire. Ces gènes sont appelés marqueurs ostéogéniques. On distingue les marqueurs précoces comme les facteurs de transcription (*distal-less homeobox 5* (Dlx5) et *runt-related transcription factor 2* (Runx2))

et les marqueurs tardifs apparaissant en fin de différenciation osseuse tels que l'OC (Figure 2.9) (Kartsogiannis & Ng 2004).

Dlx5 a un rôle essentiel dans le processus d'ossification intramembranaire, aussi bien chez la souris que chez l'humain (Bendall & Abate-Shen 2000). Runx2 est un facteur de transcription de 55 kDa qui contrôle le développement de tissus osseux en régulant la différenciation de ces cellules. Il permet l'expression de nombreuses protéines de la ECM telles que le collagène de type I, l'OPN, l'OC et la fibronectine (Komori 2010a). Runx2 est nécessaire pour orienter les MSCs vers la voie ostéoblastique. Cependant, dans les stades plus tardifs, son expression est diminuée pour permettre la formation d'os mature (Komori 2010b).

Sox9 est aussi un facteur de transcription très important pour le développement du squelette. En plus d'être indispensable à la chondrogenèse, il est également exprimé par tous les progéniteurs mésenchymateux (Bi et al. 2001; Akiyama et al. 2002; Akiyama et al. 2005). Il intervient donc également en amont de la spécialisation ostéoblastique. Dans certains environnements, les MSCs ne se différencient pas toutes de manière homogène et peuvent aussi s'orienter vers un phénotype caractérisant les chondroblastes et les adipocytes. L'étude de la combinaison de plusieurs marqueurs de différenciation permet d'évaluer quelles sont les voies cellulaires priorisées par les MSCs.

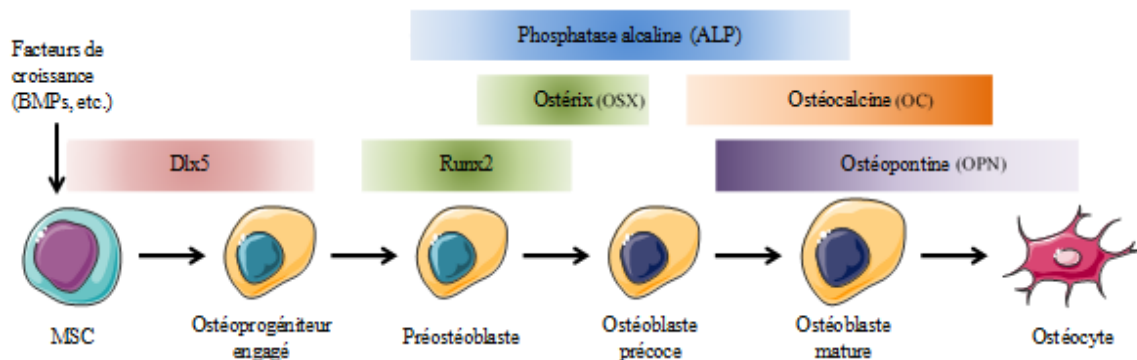


Figure 2.10 - Expression des marqueurs de différenciation ostéoblastique (Marie 2001; Luther et al. 2011; Servier Medical Art n.d.)

D'autres marqueurs sont exprimés plus tardivement dans la différenciation ostéoblastique. Ostéix (Osx) est un facteur de transcription de type doigt de zinc de 46 kDa qui intervient en aval de Runx2 pour orienter les précurseurs ostéochondroblastiques vers la voie ostéoblastique (Nakashima et al. 2002). En même temps, la phosphatase alcaline (ALP) est une enzyme située sur la membrane plasmique des cellules. Elle est très importante pour la fonction

de minéralisation des ostéoblastes. L'ALP hydrolyse les esters monophosphates pour permettre la formation d'hydroxyapatite (Orimo 2010). Plus les cellules osseuses avanceront vers la phase de minéralisation, plus elles produiront de l'ALP (Kartsogiannis & Ng 2004). L'OC est une protéine K-dépendante qui peut se lier aux cristaux d'hydroxyapatite et être stockée dans la ECM (Kartsogiannis & Ng 2004). Elle est synthétisée par les ostéoblastes matures, ce qui en fait un marqueur final de la formation osseuse. L'OPN est une phosphoprotéine retrouvée dans la matrice extracellulaire. Elle n'est pas spécifique à un type cellulaire précis puisqu'elle est exprimée aussi par les cellules nerveuses et rénales. Cependant, sa production dans le tissu osseux dépend de Runx2 (Haylock & Nilsson 2006) et elle est principalement produite pendant la phase de minéralisation de la matrice osseuse (Kartsogiannis & Ng 2004).

2.1.3.2 Facteurs biologiques influençant la réparation osseuse

2.1.3.2.1 Facteurs systémiques

L'**hormone parathyroïdienne** (PTH) est une hormone naturelle sécrétée par les glandes parathyroïdes. Elle a diverses fonctions au sein du corps humain, dont celle de moduler le métabolisme phosphocalcique (Marieb & Hoehn 2015). Elle est utilisée dans le traitement de l'ostéoporose et son effet sur la guérison des fractures est actuellement étudié (Canalis et al. 2007; Einhorn & Gerstenfeld 2015)]. Ainsi, l'administration journalière de PTH pendant la phase du remodelage osseux semble améliorer la réparation de la fracture en augmentant la formation osseuse sans induire de résorption (Alkhiary et al. 2005). L'effet de la PTH est aussi étudié sur des femmes ménopausées atteintes d'ostéoporose, et montre une accélération de la réparation des fractures (Aspenberg et al. 2010; Peichl et al. 2011).

Les glycoprotéines de la **famille des Wnts** jouent également un rôle clef dans la différenciation ostéoblastique et sont principalement sécrétées dans le milieu extracellulaire par les MSCs. Selon les voies de signalisation qu'ils activent, les facteurs Wnt peuvent être regroupés en deux catégories (Figure 2.12). Les Wnts de la voie canonique lient le complexe de récepteurs Frizzled et LPR5/6 afin de stabiliser la β -caténine cytoplasmique (Figure 2.12). Les Wnts de la voie non canonique lient Frizzled indépendamment de LRP5/6 stimulant la libération de Ca^{2+} intracellulaire par l'intermédiaire d'une protéine G. Ces voies de signalisation seront détaillées dans la section 2.1.3.3.4. Ces protéines peuvent également influencer le devenir des cellules à plus longue distance *via* des exosomes provenant de corps multivésiculaires (Gross et

al. 2012). Ces facteurs sont indispensables pour orchestrer les comportements cellulaires complexes pendant le développement (Gross et al. 2012). En effet, les Wnts contrôlent la prolifération, le mouvement cellulaire, et elles établissent la polarité des tissus (Croce & McClay 2006; van Amerongen & Nusse 2009). De récentes études montrent l'effet des Wnts sur l'amélioration de la réparation osseuse (Einhorn & Gerstenfeld 2015). En effet, l'activation des voies de signalisation des Wnts orienterait la différenciation des cellules souches en ostéoblastes plutôt qu'en adipocytes.

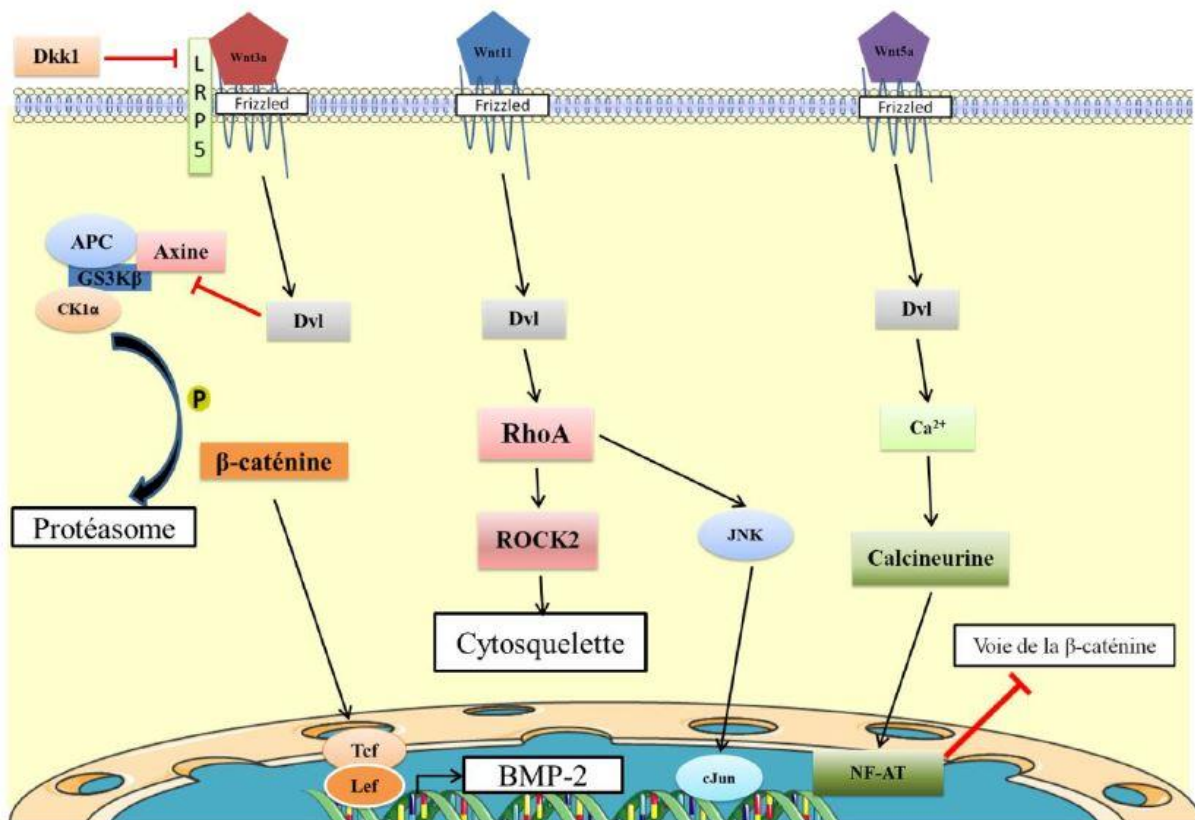


Figure 2.11 - Voies de signalisation des Wnts (Drevelle, 2013)

Les **cytokines proinflammatoires** (Il-, Il-6, TNFα) régulent également la formation osseuse endochondrale et le remodelage. Elles sont produites par de nombreuses cellules du système immunitaire (macrophages, plaquettes, granulocytes). Elles interviennent principalement dans l'initiation de la réparation tissulaire en permettant le recrutement d'autres cellules immunitaires et de MSCs.

De nombreux **facteurs de croissance** (VEGF, EGF, FGF, TGF-β, BMPs) ont des rôles importants dans les étapes de la réparation osseuse en agissant sur la prolifération et la différenciation des cellules osseuses. Les TGF-β sont des polypeptides dimériques sécrétés dans

des complexes latents leur permettant d'être séquestrés dans la ECM (Lodish et al. 2014). La dissociation du complexe latent et l'activation du TGF- β peuvent être médiées par les intégrines ou encore les peptidases. Les TGF- β sont synthétisés par les ostéoblastes, les chondrocytes, les cellules endothéliales et de nombreuses cellules immunitaires (Lodish et al. 2014). Dans le processus de réparation osseuse, le TGF- β inhibe l'apoptose des ostéoblastes et participe à leur différenciation en ostéocytes (Dufour et al. 2008; Chua et al. 2002).

2.1.3.2.2 *Les BMPs*

Les **protéines morphogénétiques osseuses (BMPs)** sont des cytokines appartenant à la superfamille des TGF- β , ayant un rôle prédominant dans la formation et la réparation des tissus osseux (Ai-Aql et al. 2008). Elles sont synthétisées directement par les MSCs, les ostéoblastes, les chondrocytes et les cellules endothéliales (Grunert et al. 2007; Ryoo et al. 2006). Les BMPs ont été identifiées en 1965 grâce à leur capacité à former de l'os ectopique dans le muscle de lapins (Urist 1965). Elles interviennent également lors du développement de l'organisme, dans les réactions inflammatoires et pendant l'angiogenèse (Helbing et al. 2011; Salazar et al. 2016). Cette famille de protéines morphogénétiques regroupe plus de 20 BMPs différentes (Bessa et al. 2008; Nakase & Yoshikawa 2006). Elles sont synthétisées sous forme de protéines précurseurs de 400 à 500 acides aminés composées de deux grands prodomaines et d'un petit dimère BMP (Aono et al. 1995; Mi et al. 2015). Elles obtiennent leur forme mature après clivage d'une séquence signal en C-terminal (Arg-XXX-XXX-Arg) par une furine nommée proprotéine convertase (PC) (Aono et al. 1995; Mi et al. 2015). Elles sont alors sécrétées dans le milieu extracellulaire où elles prennent la forme d'homodimères (BMP-2/BMP-2) ou hétérodimères (BMP-2/BMP-4). Contrairement au TGF- β , la BMP-9 peut circuler dans le milieu extracellulaire avec son prodomaine et rester active (Mi et al. 2015).

L'effet des BMPs sur le système osseux a fait l'objet de nombreuses études ces dernières années (Marquis et al. 2009; Einhorn & Gerstenfeld 2015). L'utilisation de la BMP-2 et de la BMP-7 a été approuvée par l'agence américaine de produits alimentaires et médicaux (FDA). La BMP-2 est actuellement utilisée pour la réparation de fractures osseuses de tibia et la fusion de vertèbres (Burkus et al. 2003). Des enquêtes complémentaires ont été effectuées pour vérifier leur utilisation clinique et les résultats donnent à réfléchir. L'utilisation de rhBMP-2 dans une éponge de collagène permettait la guérison complète des fractures du tibia, cependant elle ne

réduisait pas le temps de cicatrisation par rapport au traitement normalement offert (Aro et al. 2011; Einhorn & Gerstenfeld 2015).

Tableau 2.2 - Effet ostéogénique des BMPs (Adapté de Drevelle, 2013)

BMP	Type cellulaire	Concentration	Effet	Références
BMP-2	C2C12	Adénovirus	↑ activité de l'ALP (40h)	(Kang et al. 2004)
	MC3T3-E1	100 ng/ml	↑ activité de l'ALP (2 jours)	(Guicheux et al. 2003)
	C3H10 T1/2	Adénovirus	↑ activité de l'ALP (9 jours) ; ↑ expression d'ARNm codant pour OC (10 jours)	(Hongwei Cheng et al. 2003)
	MC3T3-E1	26,04 ng/ml	↑ expression de l'ARNm codant pour Osx (1 jour)	(Lauzon et al. 2014)
	MSCs	Lentivirus	↑ activité de l'ALP (3, 7, 14 et 21 jours) ↑ minéralisation de la matrice (21 jours)	(Sun et al. 2015)
BMP-4	C2C12	Adénovirus	↑ activité de l'ALP (40h)	(Kang et al. 2004)
	C3H10 T1/2	Adénovirus	↑ expression de l'ARNm codant pour OC (10 jours)	(H. Cheng et al. 2003)
	Fibroblastes de peau de souris	50 ng/ml	↑ activité de l'ALP (10 jours) ↑ concentration de calcium (21 et 35 jours)	(Myllylä et al. 2014)
BMP-3	C2C12	100 ng/ml (BMP-3 produit par Adénovirus)	↓ expression de l'ARNm codant pour Runx2, collagène de type I et OC (2 jours)	(Matsumoto et al. 2012)
	MSCs		↓ activité de l'ALP (48h)	(Kokabu et al. 2012)
BMP-6	C2C12	Adénovirus	↑ activité de l'ALP (40h)	(Kang et al. 2004)
	MC3T3-E1	Adénovirus	↑ activité de l'ALP (5 jours); ↑ expression de l'ARNm codant pour OC (10 jours)	(H. Cheng et al. 2003)
		100 et 300 ng/ml	↑ activité de l'ALP (3 et 7 jours)	(Visser et al. 2012)
	C2C12 hADSCs	50 ng/ml	↑ activité de l'ALP (7 jours)	(Rivera et al. 2013)
BMP-9	C2C12	Adénovirus	↑ activité de l'ALP (40h)	(Kang et al. 2004)
	C3H10 T1/2	Adénovirus	↑ activité de l'ALP (7 et 10 jours)	(Kang et al. 2009)
			↑ le contenu en calcium (21 jours)	(Xu et al. 2012)

			↑ activité de l'ALP (9 jours) ; ↑ expression d'ARNm codant pour OC (10 jours)	(Chen et al. 2003)
	MC3T3-E1	42,3 ng/ml	↑ expression de l'ARNm codant pour Runx2 (3 jours), Osx et OC (6 jours)	(Bergeron et al. 2009)
	MC3T3-E1	22,03 ng/ml	↑ activité de l'ALP (3 jours) et expression de l'ARNm codant pour Osx (1 jour)	(Lauzon et al. 2014)
		22,03 ng/ml + 10%FBS	↑↑↑ activité de l'ALP (3 jours) ↑↑↑ expression de l'ARNm codant pour OC (6 jours)	
		2,20 ng/ml + 10%FBS	↑ expression de l'ARNm codant pour Osx (1 jour)	
	C2C12	10 ng/ml	↑ activité de l'ALP (3 et 7 jours)	(Rivera et al. 2013)
	hADSCs	10 ng/ml	↑ activité de l'ALP (7 jours)	
BMP-12	C2C12	1000 ng/ml	Ne permet pas la différenciation en ostéoblastes à 6 jours	(Inada et al. 1996)
BMP-13	MSCs	300 ng/ml dans un milieu ostéogénique	↓ expression de l'ARNm codant pour l'ALP; ↓ activité de l'ALP (14 jours) comparé à un milieu ostéogénique	(Shen, Bhargav, et al. 2009)

Néanmoins, ce ne sont pas les seuls BMPs montrant un intérêt thérapeutique. Les BMP -2/-4/-6/-7/-9 ont la capacité d'induire une différenciation ostéogénique (Tableau 2.2). La BMP-9 a montré une activité ostéogénique supérieure à celle de la BMP-2 et -7 sur plusieurs types cellulaires comme les MSCs, les préostéoblastes et les myoblastes murins (Chen et al. 2003; Kang et al. 2004; Tang et al. 2009; Bergeron et al. 2009). Cependant, l'influence de ces différents facteurs sur les mécanismes moléculaires de la cellule n'est pas encore bien étudiée. Il est nécessaire de bien comprendre comment fonctionnent ces mécanismes pour développer des stratégies thérapeutiques sûres et efficaces.

2.1.3.3 Voies de signalisation cellulaire induites par les BMPs

2.1.3.3.1 La voie des Smads

Les BMPs, comme de nombreuses molécules de la famille des TGF- β , interagissent avec des dimères de récepteurs sérine/thréonine kinase intrinsèques de type I et de type II. Les BMPs possèdent un épitope "wrist" qui se lie au récepteur de type I et un épitope "knuckle" qui se lie au récepteur de type II (Saito et al. 2003). À ce jour, 7 récepteurs de type I et 5 récepteurs de type II ont été identifiés (Kawabata 1998). Cette diversité combinatoire permet une plus grande spécificité de liaison pour les BMPs (Tableau 2.3). La liaison de la BMP avec le dimère de

récepteur de type II entraîne un changement de conformation de celui-ci, qui permet le recrutement du dimère de récepteur de type I formant ainsi un hétérotétramère (Lodish et al. 2014). Le récepteur de type II, ayant une activité kinase constitutive, transphosphoryle un résidu sérine du récepteur de type I pour l'activer (Lodish et al. 2014).

Ceci permet d'induire différentes voies de signalisation dont celle des Smads médiée par la phosphorylation des Smad 1/5/8 (Tableau 2.3 et 2.10). Les protéines Smad sont composées de deux domaines globulaires (MH1 et MH2) reliés par un domaine linker (Macias et al. 2015). Le domaine MH1 (N-terminal) est responsable de la liaison des Smads à l'ADN, tandis que le domaine MH2 (C-terminal) permet les interactions avec de nombreux effecteurs et régulateurs impliqués dans la translocation du signal (récepteur des TGF- β , co-Smad, cofacteurs de liaison à l'ADN, modificateur de chromatine) (Macias et al. 2015).

L'activation du récepteur de type I va permettre le recrutement et la phosphorylation de protéines Smads (R-Smad) (Figure 2.10). La voie canonique des BMPs permet la phosphorylation de Smad1, Smad5 et Smad8, tandis que la voie des TGF- β et des activines implique Smad2 et Smad3 (Massagué 2012). Le récepteur de type I phosphoryle deux résidus sérine en C-terminal des R-Smad (pSer-X-pSer) (Macias et al. 2015). Les Smads activées se décrochent du récepteur et sont recrutées par un médiateur Smad cytoplasmique (Co-Smad ou Smad4) pour former un hétérotrimère. Deux R-Smads vont se lier à un Co-Smad par leur domaine MH2 pour former un complexe pouvant être transloqué au noyau (Macias et al. 2015).

Au niveau nucléaire, le complexe Co-Smad/R-Smads est phosphorylé dans sa région linker par deux kinases cycline-dépendante CDK8 et CDK9 (Alarcon et al. 2009). Ces phosphorylations favorisent la liaison du complexe avec des coactivateurs, tel que l'histone acétylase CBP/p300 qui permet le remodelage de la chromatine (Alarcon et al. 2009; Massague et al. 2005). Ce changement de conformation favorise la transcription de gènes spécifiques tels que les marqueurs précoces (Dlx5, Runx2) et tardifs de la différenciation (Osx, ALP, OC et BSP) (Massague et al. 2005). L'action de CDK8/9 permet également à la glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β) de phosphoryler le site de liaison au coactivateur du complexe Co-Smad/R-Smads, induisant son ubiquitination et sa dégradation au protéasome (Fuentelba et al. 2007; Aragon et al. 2011; Gao et al. 2009).

Tableau 2.3 - Sous-familles et récepteurs des BMPs (Mazerbourg & Hsueh 2006; Bessa et al. 2008; Senta et al. 2009)

Sous-famille des BMPs	BMPs	Récepteur de type I	Récepteur de type II	Smad	Références
BMP-2/-4	BMP-2	ALK3/6	BMPRII / ActRIIa	Smad 1/5/8	
	BMP-4	ALK3/6	BMPRII / ActRIIa	Smad 1/5/8	
BMP-3	BMP-3	ALK4	ActRIIa	Smad 2/3	
BMP-5/-6/-7/-8/-8b	BMP-5	ALK3/6	BMPRII / ActRIIa	Smad 1/5/8	Ro et al, 2004
	BMP-6	ALK2/3/6	BMPRII / ActRIIa	Smad 1/5/8	
	BMP-7	ALK2/3/6	BMPRII / ActRIIa	Smad 1/5/8	Dudley et al, 1995
	BMP-8	ALK3/6	BMPRII / ActRIIa	Smad 1/5/8	Zhao et Hogan, 1996; Zhao et al, 2001
	BMP-8b				Zhao et Hogan, 1996; Zhao et al, 2002
BMP-9/-10	BMP-9	ALK1/2	BMPRII / ActRIIa	Smad 1/5/8	David et al, 2007; David et al, 2008; Scharpfenecker et al, 2007
	BMP-10	ALK1/3/6	BMPRII / ActRIIa	Smad 1/5/8	David et al, 2007
BMP-12/-13/-14	BMP-12	ALK3/6	BMPRII / ActRIIa	Smad 1/5/8	
	BMP-13	ALK3/6	BMPRII / ActRIIa	Smad 1/5/8	
	BMP-14	ALK3/6	BMPRII / ActRIIa	Smad 1/5/8	

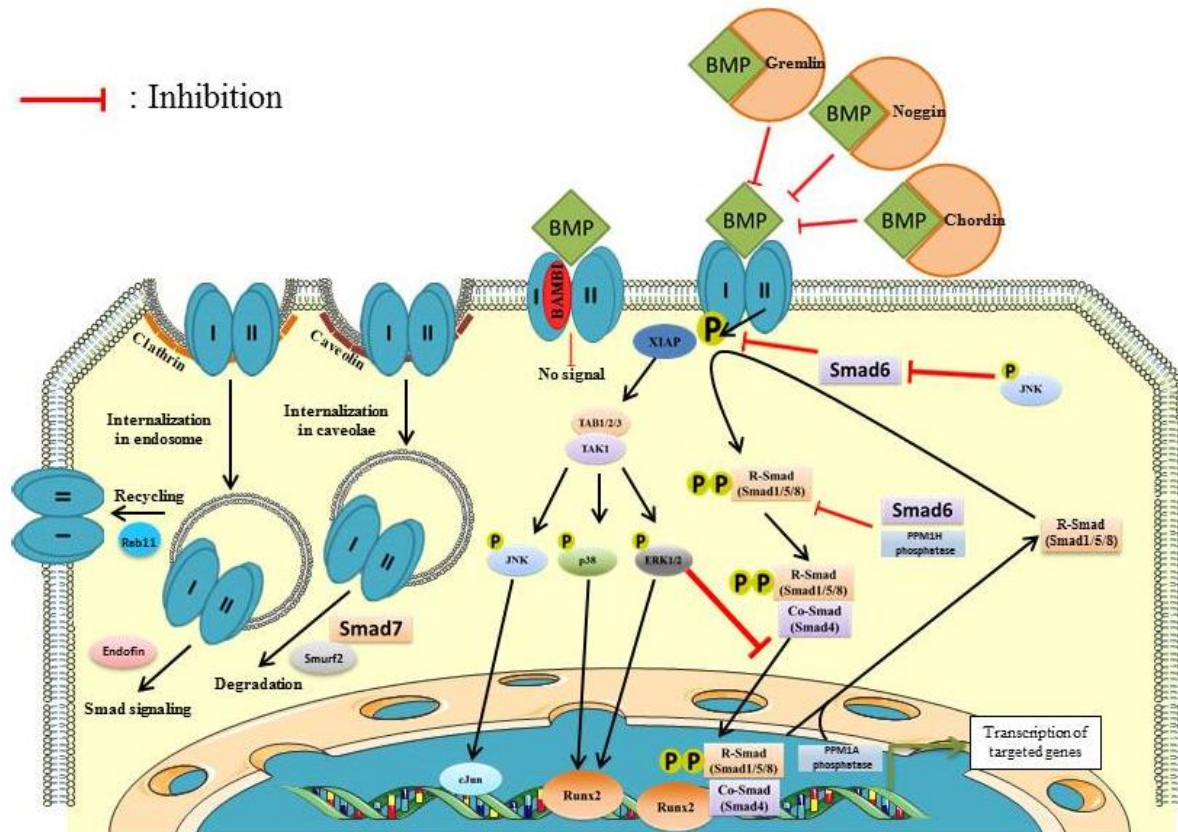


Figure 2.12 - Régulation de la signalisation induite par les BMPs (Beauvais et al. 2016)

Ces mécanismes constituent le cycle de signalisation des R-Smads, aboutissant à un pic de transcription directement suivi d'une dégradation. L'homéostasie squelettique est maintenue par un équilibre entre l'inhibition et l'activation des BMPs. La transduction des signaux induit par les BMPs peut donc être inhibée par de nombreux antagonistes extracellulaires, intracellulaires ou transmembranaires. Les antagonistes extracellulaires lient les BMPs avec une haute affinité, empêchant leurs interactions avec les récepteurs. Ces peptides sécrétés peuvent être classés en quatre sous-groupes : Noggin, Twisted gastrulation, la famille des chordins, et la famille Dan (Brazil et al. 2015; Tsiridis et al. 2007; Massague & Chen 2000). Par exemple, Noggin a une haute affinité pour la BMP-2 mais n'a aucun effet sur la BMP-9 (Zimmerman et al. 1996; Rosen 2006). Le pseudorécepteur *BMP and activin bound protein* (BAMBI) est une glycoprotéine transmembranaire qui possède un domaine extracellulaire semblable aux récepteurs de type I des BMPs (Onichtchouk et al. 1999). Elle s'associe avec le dimère de type I créant un complexe extracellulaire fonctionnel, mais ayant une modification intracellulaire qui inhibe la transduction du signal émis par la liaison du BMP (Onichtchouk et al. 1999; Massague & Chen 2000).

Une fois que le signal est émis à l'intérieur de la cellule, il peut également être bloqué par des antagonistes intracellulaires tels que Smuf-1 ou les Smad-6 et -7 (Figure 2.10) (Massague & Chen 2000). Le *Smad ubiquitination regulatory factor-1* (Smurf-1) est une E3 ubiquitine ligase qui inhibe spécifiquement la voie de signalisation des Smad (Zhu et al. 1999; Massague & Chen 2000). Elle reconnaît et ubiquitine spécifiquement les Smad-1 et -5 qui seront dégradées subséquemment dans le protéasome. Les Smad -6 et -7 (I-smad) inhibent également la voie des Smad en utilisant des mécanismes différents. Smad-6 et -7 inhibent la phosphorylation des Smad en se liant sur le domaine intracellulaire de leur récepteur de type I (Souhelnytskyi et al. 1998; Massague 1998; Imamura et al. 1997). Cependant, Smad-6 peut également se lier avec les Smads phosphorylées et entrer en compétition avec le co-Smad pour interférer dans la translocation du signal (Ishisaki et al. 1999).

2.1.3.3.2 La voie des MAPK

Les BMPs peuvent également agir *via* l'activation de la voie des *Mitogen-activated protein kinases* (MAPK). Celle-ci se divise en trois cascades de signalisation : p38, ERK1/2 et c-Jun N-terminal kinase (JNK) (Figure 2.10). L'interaction des BMPs avec leurs récepteurs de type I et de type II permet à *X-linked inhibitor of apoptosis* (XIAP) d'acquieser son rôle de protéine adaptatrice de la voie des MAPKs en recrutant *TGF- β activated kinase 1* (TAK1) et *TAK binding protein 1* (TAB1) au niveau du récepteur de type I (Yamaguchi 1999; Herpin & Cunningham 2007). TAK1, membre des MAPKinase kinase kinase, permet alors l'activation de p38, ERK1/2 et JNK, *via* différents intermédiaires appartenant à la famille des MAPKinase kinase (MKK) (Shim et al. 2009). La protéine p38 est phosphorylée par MKK3 ou MKK6, ERK1/2 est phosphorylé par MEK1 ou MEK2, tandis que JNK est phosphorylé par MEK4 ou MKK7. Une fois phosphorylés, p38, ERK1/2 et JNK sont capables de transloquer jusqu'au noyau pour activer certains facteurs de transcription comme Runx2 et permettre l'expression de gènes spécifiques (Liu et al. 2007).

Ces trois voies de signalisation peuvent avoir des effets positifs ou négatifs sur la différenciation ostéoblastique. L'activation de p38 semble être nécessaire à cette différenciation. Ainsi, en présence de BMP-2 (100ng/ml), l'inhibition de p38 diminue l'expression d'ALP et d'OC, bloquant la différenciation des préotéoblastes murins en ostéoblastes matures (Guicheux et al. 2003). De plus, l'utilisation d'un inhibiteur de p38 provoque une baisse de la production

d'ALP par les cellules C3H10T1/2 infectées par AdBMP-9 (Xu et al. 2012) et diminue également l'expression d'Osx chez les ostéoblastes murins (Wang et al. 2007). JNK semble également nécessaire à la différenciation des préostéoblastes en ostéoblastes, puisque son inhibition provoque une diminution d'expression de OC induite par la BMP-2 (100 ng/ml) (Guicheux et al. 2003). Cependant, ERK1/2 semble être un antagoniste de la différenciation ostéoblastique. Son inhibition augmente l'expression d'ALP et la synthèse de calcium chez les C3H10T1/2 stimulées par Ad-BMP-9 (Xu et al. 2012). La voie des MAPKs est importante pour le métabolisme osseux puisqu'elle interfère avec la signalisation Smad des BMPs (Rahman et al. 2015). La région "*linker*" de R-Smad peut être phosphorylée par ERK puis GSK-3 β , induisant son ubiquitination et sa dégradation au protéasome (Kretzschmar et al. 1999; Sapkota et al. 2007). De plus, la polyubiquitination de la région "*linker*" de Smad1 peut être liée par Smurf-1. Ceci bloque l'interaction de Smad1 avec le complexe du pore nucléaire, empêchant sa translocation et atténuant ainsi le signal Smad (Sapkota et al. 2007).

2.1.3.3.3 La voie des Wnt

De nombreuses études mettent en évidence les relations croisées existant entre les voies de signalisation des Wnts et des BMPs. Par exemple, la BMP-9 produite par des C3H10T1/2 transfectées par adénovirus induit l'activation de la voie canonique des Wnt après 36 heures et permet l'augmentation de l'activité de l'ALP après 7 jours (Tang et al. 2009). La BMP-2 pourrait également réguler la voie canonique des Wnts en augmentant l'expression des récepteurs LRP5/6 et en inhibant le mécanisme de dégradation de la β -caténine (Zhang et al. 2009). En outre, le facteur Wnt3a induit également la synthèse de BMP-2 par les préostéoblastes murins (Figure 2.11) (Cho et al. 2012). L'ensemble de ces études montre l'importance de la famille des Wnt dans la réparation des os.

Ainsi, les cellules sont en étroite collaboration avec leur environnement pour mener à bien les processus biologiques entourant la régénération osseuse. Elles communiquent avec les protéines de la ECM par l'intermédiaire d'intégrines pour leur permettre d'adhérer, de survivre et de répondre aux cytokines et facteurs de croissance présents dans le milieu environnant. Les facteurs de croissance telles que les BMPs induisent la transduction de nombreux signaux intracellulaires et orientent le devenir des cellules osseuses. Ces connaissances sont utilisées pour développer de nouveaux matériaux biomimétiques appliqués à la réparation/régénération

osseuse. Cette biotechnologie nécessite l'utilisation de molécules bioactives et d'un matériau approprié afin d'orchestrer le devenir structurel et fonctionnel des cellules osseuses.

2.2 Matériaux biomimétiques

2.2.1 Les cellules utilisées en combinaison avec les matériaux biomimétiques

En plus d'apporter un support mécanique et structural, les biomatériaux destinés à la réparation osseuse doivent permettre la colonisation, la prolifération, la différenciation et la synthèse d'une matrice osseuse minéralisée par les cellules ostéoprogénitrices. La capacité des cellules souches à s'auto-renouveler et à générer des cellules différenciées spécialisées en font un choix privilégié pour l'ingénierie tissulaire osseuse (Seong et al. 2010; Grayson et al. 2015) (Tableau 2.2). Ces dernières sont retrouvées dans le tissu embryonnaire ou dans des niches spécifiques du tissu adulte comme la moelle osseuse.

2.2.1.1 Les cellules souches embryonnaires (ES)

Les cellules souches embryonnaires proviennent de la masse cellulaire interne du blastocyste (stade de 40 cellules). Ce sont des cellules pluripotentes, c'est-à-dire qu'elles ne sont pas capables de produire un organisme entier viable mais elles peuvent aboutir à la formation de n'importe quelle cellule issue des 3 feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme). Par l'intermédiaire de facteurs ostéoinducteurs, les cellules souches embryonnaires peuvent se différencier en cellules osseuses de formation permettant ainsi leur utilisation en ingénierie osseuse (zur Nieden 2011; Handschel et al. 2008). Plusieurs études ont montré qu'après une étape de pré-induction *in vitro*, les ES (murines ou humaines) associées à une matrice de collagène permettaient la formation d'os ectopique *in vivo* chez le rat (Tremoleda et al. 2008; Kahle et al. 2010).

Malgré les résultats précliniques prometteurs, la stabilité et l'homogénéité du tissu osseux formé par les ES sont encore insuffisantes (Jukes et al. 2010). Leur utilisation dans des applications tissulaires comporte également un risque d'induire la formation de tumeurs ou d'activer le système immunitaire de l'hôte augmentant les risques de rejets. De plus, de nombreuses lois éthiques limitent l'utilisation de cellules souches embryonnaires dans les applications thérapeutiques (Jukes et al. 2008).

2.2.1.2 *Les cellules souches adultes*

Certaines cellules souches proviennent d'organismes adultes mais possèdent une capacité de prolifération plus faible que les cellules souches embryonnaires (Grayson et al. 2015). Les cellules souches adultes sont regroupées dans des niches possédant un environnement favorable à leur conservation. Ces sites histologiques spécifiques sont localisés dans différents tissus de l'organisme tels que la moelle osseuse, le bulbe d'un follicule pileux ou encore les villosités intestinales (Lodish et al. 2014). Elles peuvent être prélevées en grande quantité et possèdent un caractère autologue propre au patient. Ces caractéristiques sont très intéressantes pour des applications thérapeutiques.

2.2.1.2.1 *Les cellules souches pluripotentes induites (iPS cells)*

Les cellules somatiques, la totalité des cellules d'un organisme exceptée les cellules germinales, peuvent être reprogrammées en cellules souches en induisant l'activation de quatre gènes spécifiques. En effet, en 2006, Takahashi *et al.* ont proposé que certains facteurs des cellules souches embryonnaires puissent être utilisés pour induire la pluripotence de cellules somatiques adultes (Takahashi & Yamanaka 2006). Ainsi, quatre facteurs (klf-4, sox2, oct4 et c-myc) ont été identifiés et induits dans des fibroblastes de souris par l'intermédiaire de rétrovirus afin de les reprogrammer en cellules pluripotentes (d'où leur nom de cellules pluripotentes induites : iPS). La même procédure a été utilisée pour reprogrammer des cellules somatiques humaines (Takahashi et al. 2007). Cette découverte ouvre de grandes perspectives pour la médecine régénératrice puisqu'elle permet l'obtention d'une grande quantité de cellules non-différenciées autologues, tout en contournant les questions éthiques rencontrées lors de l'utilisation des ES. Cependant, les quatre facteurs utilisés pour induire la pluripotence sont aussi des oncogènes (Suva et al. 2013). Ces gènes pourraient engendrer de nombreux changements épigénétiques, *via* la modification de la chromatine, menant à la formation de tumeurs (Suva et al. 2013). Des études complémentaires doivent être effectuées afin d'améliorer l'efficacité, la reproductibilité et la sécurité de reprogrammation des iPS avant d'envisager leur utilisation dans des applications thérapeutiques (Zomer et al. 2015).

2.2.1.2.2 *Les cellules stromales mésenchymateuses (MSCs)*

Les cellules souches mésenchymateuses sont les plus utilisées dans l'ingénierie tissulaire et leur utilisation ne nécessite aucune manipulation génétique additionnelle, contrairement aux iPS (Griffin et al. 2011; Granero-Molto et al. 2008). La moelle osseuse regroupe deux familles de cellules multipotentes: les cellules souches hématopoiétiques et les cellules souches stromales mésenchymateuses (Friedenstein & Lalykina 1972; Becker et al. 1963). Les MSCs sont des cellules multipotentes capables de s'autorenouveler et de se différencier en adipocytes, en chondrocytes et en ostéoblastes *in vitro* (Dominici et al. 2006). En culture, les MSCs ressemblent morphologiquement à des fibroblastes et expriment des marqueurs spécifiques aux cellules souches tels que CD73, CD90 et CD105 (Dominici et al. 2006). Elles sont connues pour avoir un potentiel de différenciation ostéoblastique important et permettre la formation osseuse *in vivo*, ce qui en fait des candidates intéressantes pour les applications en régénération osseuse (Shang et al. 2001). De plus, le caractère autologue des MSCs permet de réduire les risques de suractivation du système immunitaire et de rejet lors de l'intervention chirurgicale.

Cependant, comme ces cellules proviennent de la moelle osseuse, le volume pouvant être prélevé chez un patient est limité et le taux de rendement reste assez faible (0,001% à 0,0001 % du nombre total de cellules prélevées) (Fraser et al. 2006). De plus, l'obtention des MSCs autologues nécessite une opération chirurgicale invasive supplémentaire pour le patient (Fraser et al. 2006).

2.2.1.2.3 *Les cellules souches dérivées d'adipocytes (ADSCs)*

Les cellules souches peuvent être retrouvées dans plusieurs sites histologiques tels que la pulpe dentaire (Estrela et al. 2011) et le cordon ombilical (Wang et al. 2011). Toutefois, le tissu adipeux constitue une source très abondante de cellules souches mésenchymateuses (Grayson et al. 2015). Ces cellules possèdent des propriétés similaires à celles retrouvées dans la moelle osseuse et sont nommées cellules souches dérivées d'adipocytes (ADSCs) (Grayson et al. 2015). Les cellules du tissu adipeux peuvent être prélevées en grande quantité à partir d'une liposuction ou résection abdominale (Grayson et al. 2015). Ces techniques sont beaucoup moins invasives que la ponction de moelle osseuse effectuée pour le prélèvement des MSCs. De plus, à partir d'1 g de tissus adipeux, on obtient 500 fois plus de cellules souches qu'à partir de la moelle osseuse (Gimble et al. 2013). La facilité d'accès et l'abondance relative des ADSC sont

des avantages pratiques très important pour des applications thérapeutiques. Cependant, la qualité et la quantité d'ADSCs obtenues peuvent varier en fonction du tissu adipeux à partir duquel elles ont été prélevées (sous cutané ou viscéral) (Prunet-Marcassus et al. 2006). Malgré leurs grandes similarités, certaines études montrent que la capacité ostéogénique des ADSCs est significativement inférieure aux MSCs de la moelle osseuse (Im et al. 2005; Hayashi et al. 2008).

Dans le cadre de ce projet de recherche de maîtrise, des cellules souches murines C3H10T1/2, très utilisées dans plusieurs travaux pour tester de manière comparative le potentiel ostéoinducteur des BMPs (Shea et al. 2003; Cheng et al. 2003), ont été employées afin d'apporter la preuve de concept du projet.

2.2.2 Les différents types de matériaux servant de substituts osseux

Les biomatériaux utilisés dans les applications osseuses peuvent être constitués de matières inorganiques (hydroxyapatite, titane), de polymères naturels (collagène), de polymères synthétiques (polycaprolactone) ou d'une combinaison de ces composés. Le tableau 2.5 regroupe les avantages et inconvénients associés à chaque type de matériau.

Depuis 1960, les chercheurs développent des biomatériaux pour contrecarrer les problèmes associés aux greffes osseuses traditionnelles (Hench 2002). Afin de diminuer les risques de rejet ou de complications postopératoires, ces matériaux doivent être **biocompatibles** et dépourvus d'éléments toxiques ou cancérogènes (Giannoudis et al. 2005; Ratner & Bryant 2004). Ils doivent également être **biodégradables** afin d'être progressivement résorbés et remplacés par le nouveau tissu formé. Ces matériaux possèdent également les propriétés mécaniques appropriées pour résister aux pressions exercées constamment sur notre squelette (Giannoudis et al. 2005). La nouvelle génération de biomatériaux cherche à mimer le plus précisément possible la physiologie osseuse, afin d'acquérir les propriétés d'ostéointégration, d'ostéoconduction et d'ostéoinduction. L'**ostéointégration** implique de fortes interactions avec le tissu osseux d'accueil, tandis que l'**ostéoconductivité** facilite la colonisation du biomatériau par le tissu osseux et les vaisseaux sanguins. L'**ostéoinduction** désigne la capacité d'un matériau à stimuler la différenciation des MSCs environnantes de l'hôte en cellules ostéoformatrices (Giannoudis et al. 2005).

Le matériau utilisé dans ce projet de recherche est un polymère synthétique : le polycaprolactone (PCL). Le PCL possède un temps de dégradation beaucoup plus long que les autres polymères (>24 mois) permettant ainsi de limiter les réponses inflammatoires, de former une masse osseuse plus dense tout en ayant un meilleur contrôle sur sa mise en forme (Savarino et al. 2007; Park et al. 2012; Choong et al. 2012). De plus, des matériaux à base de PCL sont déjà utilisés dans de multiples essais cliniques visant à combler une perte osseuse au niveau de la boîte crânienne (Schantz et al. 2006). Ces défauts osseux faisaient suite à une trépanation, technique chirurgicale consistant à ouvrir des orifices circulaires dans la voûte crânienne. Entre 2002 et 2007, plus de 200 patients ont bénéficié d'implants en PCL après une telle chirurgie (Hutmacher et al. 2007). C'est pourquoi, des substituts osseux composés de PCL tels qu'OsteoplugTM et OsteomeshTM sont actuellement commercialisés pour des applications de reconstruction des trous de trépanation ou de chirurgies craniofaciales (www.osteopore.com; Low et al., 2009).

Tableau 2.4 - Les matériaux utilisés en régénération osseuse : avantages et inconvénients (Drevelle 2013; Adapté de Marquis et al. 2009)

Matériaux	Avantages	Inconvénients	Exemples
Inorganique	<ul style="list-style-type: none"> • Biocompatible • Ostéoconductif • Ostéointégratif • Similaire à l'os • Résorbable ou non résorbable • Permet l'adsorption des BMPs 	<ul style="list-style-type: none"> • Ostéoinduction limitée • Cassant • Difficulté à définir le 3D 	<ul style="list-style-type: none"> • Corail, verre bio actif, HAP • Métaux: Titane
Polymères naturels	<ul style="list-style-type: none"> • Biocompatible • Ostéoconductif • Ostéointégratif • Permet l'adsorption des BMPs 	<ul style="list-style-type: none"> • Ostéoinduction limitée • Transmission d'agent pathogène • Difficile à stériliser 	<ul style="list-style-type: none"> • Protéines: Collagène • GAG: chitosane
Polymères synthétiques	<ul style="list-style-type: none"> • Ostéoinductif • Ostéointégratif • Fabrication reproductible • Stérilisable 	<ul style="list-style-type: none"> • Ostéoinduction limitée • Reconnaissance cellulaire parfois difficile • Possible dénaturation des protéines adsorbées 	<ul style="list-style-type: none"> • Polycaprolactone (PCL) • Acide polylactique (PLA)
Matériaux composites	<ul style="list-style-type: none"> • Combine les avantages des différents matériaux utilisés 	<ul style="list-style-type: none"> • Mélange des matériaux parfois difficile 	<ul style="list-style-type: none"> • PLA-chitosane • PLA-polyéthylène glycol-HAP

2.2.3 Les molécules bioactives

Les matériaux biomimétiques utilisés pour la réparation/régénérescence osseuse cherchent à reproduire le plus précisément possible les éléments physiologiques des tissus osseux. Pour ce faire, des protéines de la ECM telles que la fibronectine, l'OPN ou la BSP sont immobilisées sur les surfaces pour interagir avec les cellules osseuses (Schwab et al. 2013). Des facteurs de croissance tels que les BMPs ou peptides dérivés peuvent être utilisés en combinaison avec les protéines d'adhésion afin d'améliorer l'ostéoinduction des biomatériaux (Shekaran et al. 2014). Les nouvelles approches biomimétiques privilégient l'utilisation de peptides dérivés de ces molécules bioactives afin d'augmenter la reproductibilité et de diminuer les coûts associés au développement des biomatériaux (Shekaran & Garcia 2011; Collier & Segura 2011).

2.2.3.1 Protéines et peptides dérivés de la ECM

L'un des défis majeurs dans la confection de matériaux biomimétiques est d'établir des interactions avec les cellules de l'hôte. Les biomatériaux de troisième génération utilisés pour des applications orthopédiques miment spécifiquement la physiologie osseuse à l'aide de protéines de la ECM ou de leurs peptides dérivés, tels que la fibronectine, l'OPN la BSP et le collagène (Marquis et al. 2009; Schwab et al. 2013). Ces protéines peuvent être greffées aux biomatériaux de façon covalente ou par adsorption [pour plus d'information voir (Marquis et al. 2009)]. Les protéines utilisées interagissent avec des intégrines spécifiques afin d'améliorer l'adhésion, la survie, la prolifération et la différenciation des cellules osseuses (Dreville & Fauchoux 2013). Schwab *et al.* ont comparé l'influence de la fibronectine, de la vitronectine et de l'OPN, adsorbées au polystyrène, sur des MSCs humaines (Schwab et al. 2013). La fibronectine et l'OPN ont permis une meilleure prolifération cellulaire que le contrôle après 5 et 10 jours. De plus, en milieu ostéogénique, la fibronectine induit une expression plus importante des marqueurs BSP et Runx2 après 5 jours (Schwab et al. 2013). Cependant, certains problèmes sont associés à l'utilisation de ces protéines extraites de la ECM humaine ou animale tels que l'augmentation des risques d'infections et la suractivation de la réponse immunitaire (Collier & Segura 2011). De plus, une grande variabilité existe entre les lots de protéines provenant de sites histologiques ou/et de patients différents (Collier & Segura 2011). Afin d'augmenter la reproductibilité et d'abaisser les coûts associés au développement des matériaux

biomimétiques, il est judicieux de privilégier l'utilisation de peptides synthétiques dérivés de ces protéines d'adhésion (Shekaran & Garcia 2011; Collier & Segura 2011). L'utilisation de peptides synthétiques permet d'augmenter la spécificité des molécules utilisées et de cibler plus précisément certains des mécanismes biologiques induits par le biomatériau.

Les peptides d'adhésion les plus communément utilisés possèdent un motif RGD, séquence active de différentes protéines de la ECM reconnaissant diverses intégrines transmembranaires telles que $\alpha v \beta 3$ et $\alpha 5 \beta 1$ (Pierschbacher & Ruoslahti 1987). Par opposition, des peptides dérivés du collagène (DGEA, GFOGER et P15 [GTPGPQGIAGQRGVV]) sont utilisés et reconnaissent spécifiquement l'intégrine $\alpha 2 \beta$ (Reyes et al. 2007; Hennessy et al. 2009; Wojtowicz et al. 2010). Certains peptides peuvent présenter plusieurs domaines actifs tels que le peptide pFibro contenant les motifs RGD et PHSRN correspondant aux domaines FIII-10 et FIII-9 de la fibronectine (Kao et al. 2001; Beauvais et al. 2016). Le peptide pFibro fonctionnalisé sur des films de PCL a permis une meilleure adhésion des MSCs murines par rapport à un peptide dérivé de la BSP (Beauvais et al. 2016). En combinaison avec la BMP-9 ou des peptides dérivés en solution, le peptide pFibro a amélioré l'activation des voies de signalisation des Smad et des MAPK chez les MSCs murines et a permis une plus grande expression du marqueur de Runx2 (Beauvais et al. 2016). La plupart des matériaux biomimétiques appliqués au domaine osseux cherchent à moduler spécifiquement l'adhésion et l'activité des cellules de formation osseuses. Cependant, les réactions immunitaires associées à l'utilisation de biomatériaux restent une problématique majeure pour des applications thérapeutiques. Une précédente étude a montré qu'un oligopeptide contenant les domaines RGD et PHSRN (équivalent au peptide pFibro) limitait la fusion des macrophages en cellules géantes multinucléées (Kao et al. 2001). Ainsi, dans le cadre de ce projet de recherche, le peptide d'adhésion pFibro sera utilisé pour développer un matériau biomimétique favorisant l'adhésion et la différenciation des MSCs tout en limitant la formation de cellules géantes impliquées dans la réponse immunitaire des biomatériaux.

2.2.3.2 *Mélange de peptides d'adhésion et de protéines ou peptides dérivés des BMPs*

La combinaison des peptides d'adhésion et des facteurs de croissance comme les BMPs ou peptides dérivés peut être utilisée pour augmenter l'ostéogénicité des biomatériaux (Tableau

2.6). Lai et Cheng ont démontré qu'il existait des relations croisées entre les intégrines et les BMPs influençant la signalisation cellulaire des ostéoblastes (Lai & Cheng 2005).

Cependant, les BMPs ont un temps de demi-vie court et sont utilisées à des doses physiologiques massives, engendrant des effets secondaires néfastes pour les patients (Poynton & Lane 2002; McKay et al. 2007). Pour contrecarrer ce problème, les BMPs ou peptides dérivés peuvent être directement immobilisés sur les biomatériaux, empêchant leur dispersion non contrôlée dans l'organisme. La différence de taille entre des protéines entières (Ex. : BMP) et de courts peptides d'adhésion co-immobilisés peut empêcher une bonne interaction entre les cellules et le biomatériau. De plus, les coûts reliés à la production des BMPs dans *Escherichia coli* ou dans des cellules ovariennes de hamsters chinois (CHO) sont très élevés (Wozney et al. 1988). C'est pourquoi des peptides moins dispendieux ont été élaborés. Saito et al ont développé un peptide P4 correspondant aux résidus 73-92 de l'épitope « knuckle » de la BMP-2 ayant une meilleure interaction avec les récepteurs cellulaires des MSCs murines et capable d'induire leur différenciation en ostéoblastes (Saito et al. 2003). En suivant le même principe, le laboratoire de Nathalie Faucheu a développé des peptides dérivés de l'épitope knuckle de la BMP-9 humaine, le pBMP-9 et le SpBMP-9, constitués de 23 acides aminés (deux cystéines ont été remplacées par 2 sérines dans le cas du SpBMP-9) (Bergeron et al. 2009; Lauzon et al. 2012; Beauvais et al. 2016).

Afin d'optimiser le développement de matériaux biomimétiques, il est primordial de sélectionner scrupuleusement les peptides d'adhésion utilisés en combinaison aux peptides dérivés de BMPs. He et al. (2008) ont co-immobilisé le peptide d'adhésion GRGD (1.62 pmol/cm²) et le peptide P4 dérivé de la BMP-2 (5.2 pmol/cm²) (He et al. 2008). Ces peptides ont agi en synergie sur les MSCs de rat afin d'augmenter l'activité de l'ALP et de stimuler une meilleure minéralisation de la matrice, comparativement aux peptides greffés séparément (He et al. 2008). Ces deux mêmes peptides ont été immobilisés sur une monocouche auto-assemblée utilisant des clics chimiques pour créer des gradients de concentrations (Moore et al. 2011). L'effet synergique de la combinaison des peptides RGD et P4 (65 pmol/cm² de chaque peptide) a permis d'augmenter les niveaux d'expression de BSP et la minéralisation de la matrice, sans ajout ostéogénique supplémentaire. Une autre étude a évalué l'influence de la co-immobilisation d'un peptide dérivé de la BMP-7 et d'un peptide RGD cyclique greffés à un substrat de quartz sur le devenir des MSCs de rats (Yin et al. 2014). L'utilisation du peptide RGD cyclique a

permis une plus grande affinité avec l'intégrine $\alpha v \beta 3$ (Bellis 2011; Patel et al. 2012) et donc une meilleure adhésion cellulaire que le RGD linéaire. La co-immobilisation de ces deux peptides a amélioré le niveau d'activité de l'ALP et la minéralisation de la matrice (Yin et al. 2014).

Tableau 2.5 - Ciblage d'intégrines spécifiques pour améliorer la réponse cellulaire induite par les facteurs de croissance (Adapté de Beauvais et al., 2016)

Intégrines	Facteurs de croissance	Conditions de culture	Réponses cellulaire	Références
Beta1	BMP-2	<i>In vitro</i> (MC3T3-E1)	- Le blocage de la sous unité intégrine $\beta 1$, ↓ la transcription et la sécrétion de BMP-2 induit par stimulation mécanique - BMP-2 induit la différenciation des MC3T3-E1 (↑ d'ARNm de Runx2, Osx and ALP à 12h)	(Mai et al. 2013)
	BMP-2	<i>In vitro</i> (MSCs)	- ↑ synthèse de $\beta 1$ sur une surface d'alumine fonctionnalisée avec BMP-2 après 2 jours, comparativement à l'alumine seule	(Song et al. 2014)
	BMP-9, pBMP-9 ou SpBMP-9	<i>In vitro</i> (C3H10 T1/2)	Comparativement au PCL-pBSP, le PCL-pFibro permet: - Meilleure organisation du cytosquelette, - ↑ signalisation des Smad 1/5 et des MAPK, - ↑ expression du marqueur ostéogénique Runx2	(Beauvais et al. 2016)
Alpha2 Beta1	BMP-2	<i>In vivo</i> (B6129SF2/J wild-type mice)	- Un échafaudage ciblant l'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ combiné à la BMP-2 permet une meilleure réparation osseuse que l'échafaudage ciblant seulement l'intégrine	(Shekaran et al. 2014)
	BMP-2, BMP-7	<i>In vitro</i> (hMSCs*)	- ↓ de la sous unité intégrine $\alpha 2$ est corrélée avec ↓ de la migration cellulaire induite par les BMPs comparativement au contrôle	(Haasters et al. 2014)
	BMP-2	<i>In vitro</i> (MSCs de rats)	- L'ancrage covalent de Collagène I et de BMP-2 a induit ↑ de l'expression de Runx2 après 6 jours et ↑ du dépôt de calcium après 21 jours.	(Rasi Ghaemi et al. 2016)
Alpha5 Beta1	BMP-2	(hMSCs*) (MSCs, Sprague-Dawley rats)	Fragments dérivés de la fibronectine: - ↑ l'adhésion cellulaire, comparativement à un hydrogel-acide hyaluronique seul - ↑ formation osseuse <i>in vivo</i> , comparativement à un hydrogel-acide hyaluronique seul	(Kisiel et al. 2013)
	VEGF-A (20 ng/mL)	<i>In vitro</i> (HUVEC)	- ↑ de l'expression des sous-unités d'intégrine $\alpha 5$ et $\beta 1$ (2-4h) - ↑ d'ARNm COX-2 induit par le VEGF-A	(Mena et al. 2014)
	IGF-2	<i>In vitro</i> (hMSCs)	- Le blocage des sous-unités d'intégrine $\alpha 5$ et $\beta 1$ ↓ synthèse d'IGF-2 - Alpha5 $\beta 1$ ↑ la signalisation d'IGF-2 <i>via</i> les voies de FAK et PI3K	(Hamidouche et al. 2010)
Alphav Beta3	VEGF	<i>In vitro</i> (HUVEC)	- ↑ de la phosphorylation de l'intégrine $\beta 3$ en présence de VEGF - Utilisation d'anticorps pour bloquer les sous-unités d'intégrine αv et $\beta 3$ inhibe la phosphorylation du récepteur de VEGF-2	(Mahabeleshwar et al. 2007)
	FGF-1	<i>In vitro</i> (NIH3T3)	- FGF-1 lie directement l'intégrine $\alpha v \beta 3$	(Mori et al. 2008)
	FGF-1	<i>In vitro</i> (NIH3T3, HUVEC)	- FGF-1 forme un complexe ternaire avec l'intégrine $\alpha v \beta 3$ et le récepteur FGF, nécessaire au maintien de la phosphorylation Erk1/2	(Yamaji et al. 2010)

	IGF-1 (200 ng/mL)	<i>In vitro</i> (OSE-3T3)	- IGF-1 induit l'activité de Cbfa1 en utilisant la voie PI3K - L'utilisation d'inhibiteur de l'intégrine $\alpha\beta$ 3 inhibe également l'activité de Cbfa1 induite par IGF-1	(Dai et al. 2014)
	BMP-2	<i>In vitro</i> (MC3T3-E1)	- rCYR61 influence la différenciation des préostéoblastes MC3T3-E1 induite par BMP-2 via l'intégrine $\alpha\beta$ 3 - \uparrow de rCYR61 induit \uparrow de la synthèse de BMP-2	(Su et al. 2010)
	pBMP-9 (400 ng/mL)	<i>In vitro</i> (MC3T3-E1)	- pBMP-9 induit \uparrow de la sous-unité intégrine $\alpha\beta$ dans les membranes cellulaires - pBMP-9 \uparrow l'activité de l'ALP après 24h, comparativement aux cellules non stimulées	(Marquis et al. 2008)
	RGD + pBMP-2	<i>In vitro</i> (hMSCs)	- \uparrow minéralisation des MSCs après 14 jours, comparativement au pBMP-2 ou RGD seul	(Moore et al. 2011)
	GGRGDS + pBMP2	<i>In vitro</i> (hBMSCs)	- Co-immobilisation de GGRGDS et pBMP2, \uparrow l'expression de Runx2 après 4 semaines sans ajout de milieu ostéogénique	(Bilem et al. 2016)

* hMSC de patient sain et ostéoporotique

Plus récemment, un peptide d'adhésion contenant le peptide RGD et un peptide dérivé de la BMP-2 ont été greffés sur du verre afin d'améliorer l'ostéogénèse des MSCs humaines (Bilem et al. 2016). Différents peptides dérivés de la BMP-2, 7 ou 9 ont été greffés sur une surface de polyéthylène téréphtalate (PET) avec un peptide d'adhésion (GRGDSPC) pour évaluer la différenciation de préostéoblastes murins (Zouani et al. 2010). Cette modification biomimétique de surface a permis l'augmentation du niveau d'expression de Runx2, ainsi qu'une production accrue de matrice extracellulaire par les préostéoblastes murins MC3T3-E1 (Zouani et al. 2010). Cependant, les BMP-2, 7 et 9 n'appartiennent pas à la même famille de facteurs de croissance et n'interagissent pas avec les mêmes récepteurs cellulaires (Marquis et al. 2009). De plus, le laboratoire du Professeur Faucheu a mis en évidence qu'elles n'agissaient pas de la même façon sur la prolifération et la différenciation des cellules osseuses (Drevelle et al. 2013). Pour un meilleur contrôle de l'effet ostéoinducteur du biomatériau, il faudrait acquérir une meilleure compréhension de l'influence de chacune des BMPs, avant d'envisager de les combiner. Contrairement à la majorité des études citées, il serait également judicieux d'utiliser des peptides négatifs en contrôle afin de valider que les effets ostéoinducteurs observés sont réellement dus aux peptides utilisés.

Malgré le nombre accru d'études portées sur le développement de matériaux biomimétiques, les connaissances actuelles permettant d'expliquer les mécanismes engendrés par les interactions cellules-biomatériaux sont assez limitées. Une des stratégies récemment explorée consiste à concevoir des biomatériaux fonctionnalisés avec des peptides d'adhésion

agissant de concert avec des facteurs de croissance tels que les BMPs. Les résultats du groupe de recherche de la Professeure Fauchoux montrent que l'utilisation du peptide SpBMP-9 en solution (300 fois moins cher que le BMP-9) en combinaison avec le PCL-pFibro améliorait l'adhésion et la différenciation ostéoblastique des MSCs murines (Beauvais, et al. 2016). Les molécules actives ou peptides dérivés peuvent également être immobilisés directement sur les matériaux biomimétiques afin d'obtenir des surfaces multifonctionnelles tout en empêchant leur diffusion incontrôlée dans l'organisme. Ce procédé permettrait également d'étudier les interactions intégrine spécifique-récepteur BMP pour optimiser la réponse ostéoblastique des MSCs et confectionner des matériaux biomimétiques plus performants. Ainsi, ce projet de maîtrise consiste à développer des films de PCL biomimétiques co-fonctionnalisés par des peptides d'adhésion (pFibro) et/ou des peptides dérivés de la BMP-9 (SpBMP-9 ou contrôle négatif NSpBMP-9) afin de concevoir un matériau biomimétique ostéoinducteur. Contrairement à la majorité des études précédemment effectuées dans le domaine, l'utilisation d'un peptide négatif NSpBMP-9 en contrôle permet de vérifier les réponses cellulaires induites par le biomatériau. Notre étude analyse l'influence des films de PCL co-fonctionnalisés sur la capacité d'adhésion (étalement cellulaire, formation de points focaux d'adhésion), d'activation des voies de signalisation intracellulaire (activation et translocation de la voie des Smad) et de différenciation cellulaire (expression des marqueurs ostéogénique, chondrogénique et adipogénique) des MSCs murines C3H10 T1/2.

CHAPITRE 3 DIFFÉRENCIATION OSTÉOBLASTIQUE DE CELLULES SOUCHES MURINES SUR DES FILMS DE POLY(ÉPSILON)CAPROLACTONE BIOMIMÉTIQUES

3.1 Avant-propos

Titre original: Osteoblastic commitment of murine stem cells on biomimetic poly(epsilon)caprolactone films

Auteurs et affiliation:

Jessica Jann, BcS : étudiante à la maîtrise, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Olivier Drevelle, PhD : assistant de recherche, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et génie biotechnologique.

Marc-Antoine Lauzon, PhD : professeur adjoint, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique.

Nathalie Fauchoux, PhD : professeur, Université de Sherbrooke, Faculté de génie, Département de génie chimique et de génie biotechnologique; Centre de recherche clinique du Centre Hospitalier Universitaire de Sherbrooke.

Date de soumission: 23 février 2018

État de l'acceptation: En soumission

Revue: Tissue Engineering Part A

Contribution au document:

Cet article participe au mémoire en démontrant les points suivants:

- La co-localisation des peptides pFibro et SpBMP-9 sur les films de PCL promeut l'adhésion cellulaire en permettant une meilleure organisation des points focaux d'adhésion et du cytosquelette d'actine des cellules C3H10 T1/2.
- Le peptide SpBMP-9, dérivé du facteur de croissance BMP-9, garde ses propriétés ostéoinductives lorsqu'il est immobilisé sur les films de PCL.
- Les films de PCL fonctionnalisés avec le SpBMP-9 (PCL-SpBMP-9 et PCL-pFibro/SpBMP-9) améliorent l'activation et la translocation de la voie canonique des Smad 1/5.
- Les films de PCL fonctionnalisés avec le SpBMP-9 (PCL-SpBMP-9 et PCL-pFibro/SpBMP-9) renforcent l'expression de Runx2, un facteur de transcription essentiel dans la différenciation ostéoblastique, sans induire la spécialisation des cellules souches murines en adipocytes.
- Les relations croisées entre les intégrines reconnaissant le pFibro et les récepteurs du SpBMP-9 ont amélioré à la fois l'adhésion et la différenciation ostéoblastique des cellules souches murines. Ainsi, la co-fonctionnalisation de la surface de matériaux par les peptides pFibro et SpBMP-9 semble être une approche prometteuse pour le développement de matériaux biomimétiques utilisés dans des applications cliniques ou d'ingénierie tissulaire osseuse.

Résumé français:

Les biomatériaux capables de contrôler le comportement des cellules souches jouent un rôle majeur dans la médecine régénérative et l'ingénierie tissulaire. Nous avons précédemment montré que des films de poly(epsilon)caprolactone (PCL) fonctionnalisés avec des peptides d'adhésion dérivés de la fibronectine (pFibro) amélioraient l'engagement ostéoblastique des cellules multipotentes C3H10 T1/2 induites par un peptide soluble dérivé de la BMP-9 (SpBMP-9). Ici, nous avons évalué l'effet des films PCL co-fonctionnalisés avec pFibro et/ou SpBMP-9 sur l'adhésion, la signalisation et la différenciation des cellules souches C3H10 T1/2. Les films PCL-SpBMP-9 et PCL-pFibro/SpBMP-9 ont tous les deux amélioré l'activation et la translocation nucléaire de Smad 1/5 et favorisé l'expression des marqueurs précoces de la

différenciation ostéoblastique. L'utilisation de peptides inactifs NSpBMP-9 a confirmé la spécificité et l'efficacité de SpBMP-9. Cependant, la co-fonctionnalisation du pFibro et du SpBMP-9 sur des films PCL était essentielle pour améliorer l'adhérence des cellules souches en permettant une bonne organisation des points focaux d'adhésion et l'activation de la FAK. Par conséquent, les matériaux de surface co-fonctionnalisés avec pFibro et SpBMP-9 pourraient être très utiles afin de développer des structures 3D pour des applications d'ingénierie osseuse et tissulaire.

3.2 Abstract

Biomaterials that can control the behaviour of stem cells play a major role in regenerative medicine and tissue engineering. We previously showed that poly(epsilon)caprolactone (PCL) films functionalized with adhesive peptides derived from fibronectin (pFibro) enhanced the osteoblastic commitment of multipotent C3H10T1/2 cells induced by a soluble peptide derived from BMP-9 (SpBMP-9). Here, we evaluated the effect of PCL films functionalized with pFibro and/or SpBMP-9 on adhesion, signalling and commitment of C3H10T1/2 stem cells. Both PCL-SpBMP-9 and PCL-pFibro/SpBMP-9 improved the activation and nuclear translocation of Smad 1/5 and favoured the expression of early markers of osteoblastic differentiation. The use of inactive peptides NSpBMP-9 confirmed the specificity and effectiveness of SpBMP-9. However, pFibro and SpBMP-9 co-functionalization on PCL films was essential to enhance the adhesion of stem cells with well-organized focal adhesion points and FAK activation. Therefore, material surface co-functionalized with pFibro and SpBMP-9 could be most useful for developing scaffold for bone and tissue engineering applications.

Keywords: peptide, BMP-9, RGD, fibronectin, cell signaling, Runx2

3.3 Introduction

The ageing of the world population in recent years has resulted in bone loss and fractures becoming considerably more common and hence a public health problem (McPhee et al. 2016). The USA population over 65 is projected to double to 98.2 million by 2060 (Federal Interagency Forum on Aging-Related Statistics 2016). Biomaterials that mimic bone physiology and favour mesenchymal stem cell (MSC) adhesion and differentiation are currently being developed to

serve as a bone substitute and tissue engineering scaffold (Shekaran et al. 2014; Fraioli et al. 2015).

The biomaterial surface and cells must interact to provide instructions directly from the substratum to the cells (Fraoli et al. 2015). But bone cells will better adhere to polymers that have been functionalized with peptides containing the cell-binding sequence Arg-Gly-Asp (RGD) that is found in several extracellular matrix proteins (eg. bone sialoprotein (BSP), fibronectin) (Rezania & Healy 2000; Marquis et al. 2008; Pierschbacher & Ruoslahti 1987; Zhang et al. 2011). Few studies have investigated the effect of such material functionalization on the response of stem cells to bone repair growth factors like bone morphogenetic proteins BMPs (Drevelle et al. 2010; Drevelle et al. 2013; Shekaran et al. 2014). BMPs initiate intracellular signalling by binding to type I and type II Ser/Thr kinase receptors and stimulating the BMP canonical pathway via Smad 1/5 phosphorylation (pSmad 1/5) (Carreira et al. 2015). Then, pSmad 1/5 form a heterodimeric complex with a co-Smad (Smad4) that is translocated to the nucleus (Whitman 1998), where it binds to DNA and regulates the expression of genes encoding transcription factors involved in osteogenic differentiation, Runx2 and Osterix (Osx) (Cao & Chen 2005; Sieber et al. 2009; Matsubara et al. 2008).

While only recombinant human BMP-2 and BMP-7 are approved by the Food and Drug Administration (FDA) for commercial use (White et al. 2007; Burkus et al. 2004), there are several other BMPs with therapeutic potential. The BMPs -2 /-4 /-6 /-7 and -9 can all induce osteogenic differentiation (Lavery et al. 2008; Bessa et al. 2008; Cheng et al. 2003), although BMP-9 is a better osteoinducer than BMP-2 or BMP-7 both *in vitro* and *in vivo* (Kang et al. 2004; Kang et al. 2009; Luu et al. 2007; Sreekumar et al. 2017).

While BMP therapy has successfully stimulated bone repair, the current commercial drug delivery systems use doses of BMP that are greater than the normal human physiological concentrations (Schmidmaier et al. 2008). Their use leads to complications such as ectopic bone formation, nerve damage and inflammation, and considerably increases the cost of treatment (De Long et al. 2007; Yoon & Boden 2002; Bishop & Einhorn 2007). These problems could be overcome by developing other strategies resulting in safer, more effective and less costly bone healing (Wozney et al. 1988). One solution is to use small peptides that mimic BMP type II receptor binding sites. These peptides are readily synthesized and are 300 times less expensive than the native protein. Saito *et al.* developed several peptides, corresponding to residues 73-92

of the BMP-2 knuckle epitope, that induce C3H10T1/2 murine multipotent cells to differentiate into osteoblasts (Saito et al. 2004; Saito et al. 2003). We have extrapolated this concept to produce peptides derived from the knuckle epitope of BMP-9 (pBMP-9 or SpBMP-9), since BMP-9 is a better inducer of bone than either BMP-2 or BMP-7 (Kang et al. 2004). We found that pBMP-9 induced osteoblast differentiation *in vitro* and bone formation *in vivo* (Bergeron et al. 2007; Bergeron et al. 2012; Bergeron et al. 2009).

The peptides derived from BMPs can be used in combination with adhesive peptides to develop osteoinductive materials (Madl et al. 2014; Ma et al. 2016), thus reducing the risk due to using supraphysiological doses of BMP. Materials (glass or polymers) functionalized with both adhesive peptides and peptides derived from BMP-2, BMP-7 and/or BMP-9 can be prepared. These peptides act together to promote the osteoblastic differentiation of preosteoblasts (Zouani et al. 2010) or MSCs (He et al. 2008; Moore et al. 2011; Bilem et al. 2016). However, most studies have not used adhesive peptides targeting specific integrins or verified the impact of functionalization on cell behaviour using inactive BMP-derived peptides as controls. The selection of adhesive peptides is crucial in the design of biomimetic materials (Marquis et al. 2008). A peptide pFibro containing sequences of both cell binding domain (RGD) and synergistic site (PHSRN) of the fibronectin covalently bound to poly(epsilon)caprolactone (PCL) film (PCL-pFibro) promoted more C3H10T1/2 cells induced by soluble BMP-9, pBMP-9 and SpBMP-9 to become osteoblasts than did a peptide derived from BSP (Beauvais, Drevelle, Lauzon, et al. 2016). pFibro targeted mainly the $\alpha 5 \beta 1$ integrins, whereas the BSP-derived peptides were bound to $\alpha v \beta 3$ integrins (Hynes 2002; Tian et al. 2012).

This study therefore examines the effect of PCL films functionalized with pFibro and/or SpBMP-9 or its negative peptide, NSpBMP-9, used as control. The residue required for binding to BMP type II receptor in SpBMP-9 have been modified by Glycine in NSpBMP-9. We first determined the densities of the grafted peptides and then the effect of the functionalized PCL films on the behaviour of C3H10T1/2 cells. We measured cell attachment, spreading, focal adhesion formation and Smad signalling pathway activation. Finally, we assessed the differentiation of attached C3H10T1/2 cells into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages by assaying specific protein markers.

3.4 Materials

The peptide pFibro (Ac-CGGPHSRNGGGGGGGRGDG-NH₂) derived from fibronectin motifs, SpBMP-9 (Ac-CGGKVGKASSVPTKLSPISVLYK-NH₂) and negative peptide NSpBMP-9 (Ac-CGGKVGKAGGVPTKLSPIGGLYK-NH₂) derived from the “knuckle” epitope of BMP-9 were synthesized (final purity > 98%) by EZBiolab (Carmel, IN, USA). C3H10T1/2 murine multipotent cells (clone 8, CCL-226TM) were purchased from ATCC® (Manassas, VA, USA). Penicilin, streptomycin, 0.25% trypsin-EDTA, minimum essential medium α without ascorbic acid (α MEM) and trypsin inhibitor were from Gibco® (Life Technologies, Grand Island, NY, USA). N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC) and N-hydroxysuccinimide (NHS) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). 2-(2-pyridinyldithio) ethaneamine hydrochloride (PDEA) was purchased from GE Healthcare (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden). Primary rabbit antibodies directed against phosphorylated Smad1/Smad5 (Ser463/465), and GAPDH (14C10) were purchased from Cell Signaling Technology (Pickering, ON, USA). Primary mouse antibodies against Runx2 (F-2; sc-390351), Osx (F-3; sc-393325) and PPAR γ (E-8; sc-7273) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). Primary mouse antibodies directed against Sox9 (SAB4502834), primary monoclonal rabbit antibodies for immunostaining phosphorylated FAK (pFAK on Y397) and vinculin, peroxidase-conjugated anti-mouse IgG secondary antibodies and FITC-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies were from Sigma-Aldrich. Peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies were from GE Healthcare.

3.5 Methods

3.5.1 Preparation of PCL films

PCL films were prepared and functionalized with adhesive peptides as previously described (Drevelle et al. 2010). Briefly, PCL dissolved 1,4-dioxane (5% w/v) was placed in glass Petri dishes (19.7 cm²) and the solvent was allowed to evaporate by heating at 80°C overnight. The PCL films were hydrolysed with 0.5 mol/L NaOH for 2h under gentle agitation at room temperature, washed with ultra-pure water and incubated with 0.01 mol/L HCl for 30 min. Then films were incubated with EDC (0.904 mg/mL)/NHS (0.149 mg/mL) for 20 min at

room temperature. Then, they were incubated with PDEA (0.15 mg/mL) for 1 h at room temperature, washed with PBS, and incubated with SpBMP-9, NSpBMP-9 and/or pFibro solution (total concentration: 0.123×10^{-9} mol/cm² peptide) for 30 min at room temperature with agitation. Finally, the treated PCL films were sterilized by submersion in 70% (v/v) ethanol for 30 min.

3.5.2 Assessing peptide density on PCL films

The density of peptides bound to PCL was determined indirectly by measuring the concentration of peptides remaining in the supernatant after incubation (four independent experiments). Briefly, the non-grafted peptides remaining in the supernatant from three solutions were removed from PCL, pooled and freeze dried to concentrate them. Then the resulting powder was suspended in ultra-pure sterile water. The concentrations of SpBMP-9 and NSpBMP-9 were determined by analytical high-performance liquid chromatography (HPLC) (Model 335, Varian, Agilent Technology; C18 HPLC Column, Phenomenex®) coupled to a fluorescence detector [(For SpBMP-9 and NSpBMP-9: λ_{ex} = 274 nm, λ_{em} = 310 nm), Varian model 363, Agilent Technology] and/or by measuring absorbance at 205 nm (Biotek synergy HT). The HPLC elution gradient was (A) acetonitrile containing 0.1% (v/v) TFA and (B) water containing 0.1% (v/v) TFA (flow rate: 1 mL/min). Data were analysed with the Galaxie Chromatography Data System v 1.9.301.220. Sample concentrations were calculated by comparing the areas under the eluted peaks with those of peptide standard curves. Peptide pFibro-FITC concentrations were determined fluorimetrically using a Tecan Safire 2 instrument (Tecan SafireII, Tecan US inc., NC, USA). The fluorescence (λ_{ex} = 495 ± 15 nm, λ_{em} = 522 ± 15 nm) from each well was analysed using XFLUOR4SAFIREII Version 4.62n software. Sample concentrations were calculated by comparison with those of a standard curve of pFibro-FITC. The concentrations of pFibro, SpBMP-9 and/or NSpBMP-9 remaining in the post-incubation supernatant were also calculated and the density of each peptide on PCL film was evaluated (Tableau 3.1).

Tableau 3.1 – Peptide density on PCL film

Conditions	Immobilized peptide density (pmol/cm ²)		
	pFibronectin	SpBMP-9	NSpBMP-9
PCL-Hydro	-	-	-
PCL-pFibro	81.3 ± 1.9	-	-
PCL-pFibro/SpBMP-9	44.3 ± 1.9	32.7 ± 5.3	-
PCL-SpBMP-9	-	66.5 ± 2.9	-
PCL-pFibro/NSpBMP-9	44.2 ± 1.9	-	30.6 ± 3.7
PCL-NSpBMP-9	-	-	67.4 ± 2.2

3.5.3 Cell experiments

C3H10T1/2 cells (passages 10 – 15) were grown up to 80% of confluence at 37 °C under a humidified 5% CO₂ atmosphere in α MEM, supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin, detached with trypsin (5 min/37 °C) and the trypsin neutralized with trypsin inhibitor. They were collected by centrifugation (1000 rpm, 5 min), suspended in α MEM without FBS, and seeded at 10,000 or 20,000 cells/cm² on sterile PCL-Hydro, PCL-pFibro, PCL-pFibro/SpBMP-9, PCL-SpBMP-9, PCL-pFibro/NSpBMP-9 or PCL-NSpBMP-9 film.

3.5.4 Staining of actin stress fibers, DNA and immunolabelling of vinculin, pFAK and Smad

Cells (10,000 cells/cm²) on sterile PCL films were incubated for 4 h in serum-free medium, fixed with paraformaldehyde (3% w/v in PBS) for 15 min at room temperature and permeabilized with Triton X-100 (0.5% v/v in PBS) for 5 min at room temperature. Non-specific binding sites on the films were blocked by incubating the film with 3% (w/v) skimmed milk for 30 min at 37 °C under a humidified 5% CO₂ atmosphere. Cells were then immunostained by incubation for 30 min at 37 °C under a humidified 5% CO₂ atmosphere with rabbit monoclonal anti-vinculin antibodies (diluted 1:100), rabbit primary antibodies against phosphorylated FAK (pFAK) on Y397 (diluted 1:100) or rabbit primary antibodies against pSmad 1/5 (diluted 1:75) and washed with PBS. The cells were incubated for 30 min at 37 °C under a humidified 5% CO₂

atmosphere with solution containing FITC-conjugated anti-rabbit IgG (diluted 1:150 to stain vinculin, diluted 1:200 to stain pFAK and diluted 1:150 to stain pSmad 1/5). F-actin and nuclei were counterstained with Alexa Fluor® 594 phalloidin diluted 1:150 (Invitrogen, Eugene, OR, USA) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) with a final concentration of 1 µg/mL respectively. The films were mounted in PBS/glycerol (50%/50%, v/v) on glass microscope slides, and examined with an Eclipse TE2000-S microscope (Nikon Instruments Inc.) equipped with a 10x or 60x objective and CCD camera (Moticam Pro CCD 285C, Motic, Hong Kong). The immunolabelling images were merged and both cell spreading area and cell counts were evaluated using programs established by Marc-Antoine Lauzon on the MATLAB software (2013 MathWorks®) as previously described (Lauzon et al. 2016).

3.5.5 Western blot analysis of Smad 1/5 phosphorylation

Cells (20,000 cell/cm²) adhered on appropriate sterile PCL films were incubated for 0.5, 1, 2 and 4 h in serum-free medium, washed with PBS and lysed with 50 mM Tris-HCl containing 0.1% (v/v) SDS, a mini-protease inhibitor tablet (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) and 1 mM orthovanadate. Equal amounts of protein were separated by SDS-PAGE, and the separated proteins transferred to nitrocellulose membranes using the Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). These membranes were washed with 0.1% (v/v) Tween®20 in PBS and Western blotting performed as previously described (Beauvais et al. 2016). The protein bands were revealed by incubation with primary rabbit antibodies to pSmad1 (Ser 463/465)/Smad5 (Ser 463/465) (diluted 1:1,000). Antigen-antibody complexes were detected by incubating them with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (diluted 1:7,500). The membranes were reprobed with anti-GAPDH antibodies (diluted 1:8,000). The resulting antigen-antibody complexes were visualised by incubating membranes with peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (diluted 1:10,000). Immunoreactive bands were visualized by chemiluminescence (ECL Plus™, GE Healthcare) and exposure to X-ray film (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA). A densitometry image analysis program (Matlab) was used for densitometric analyses.

3.5.6 Western blot analysis of Runx2, Osterix, Sox9 and PPAR γ

Cells (20,000 cells/cm²) were incubated for 4 h in serum-free medium and then with 1% (v/v) FBS for 3 or 6 d. Runx2, Sox9, PPAR γ and Osx proteins were assayed by Western blotting as described above. Protein bands were located by incubation with primary rabbit antibodies to Runx2 (diluted 1:500), Osx (diluted 1:500), Sox9 (diluted 1:1,000), PPAR γ (diluted 1:500) and GAPDH (diluted 1:2,000) and antigen–antibody complexes were visualized by incubation with peroxidase-conjugated anti-mouse IgG secondary antibodies (diluted 1:7,500) or peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibodies (diluted 1:10,000).

3.5.7 Statistical analysis

Analysis of variance (ANOVA) and subsequent statistical analyses (Tukey–Kramer studentized range post-hoc tests) were performed using Excel (Excel 2013®). Only differences with a $p < 0.05$ were considered significant.

3.6 Results

3.6.1 Peptide density on functionalized films

The functionalized PCL films were first characterized by indirectly determining the densities of bound peptides. The density of pFibro bound to the PCL-pFibro films was 81.3 ± 1.9 pmol/cm², while that on PCL-pFibro/SpBMP-9 was 44.2 ± 1.9 pmol/cm² and that on PCL-pFibro/NSpBMP-9 was 44.3 ± 1.9 pmol/cm² (Tableau. 3.1). The peptide densities of SpBMP-9 and NSpBMP-9 bound to PCL on PCL-SpBMP-9 and PCL-NSpBMP-9 were similar (66.5 ± 2.9 and 67.4 ± 2.2 pmol/cm², respectively). The densities of SpBMP-9 and NSpBMP-9 on PCL-pFibro/SpBMP-9 and PCL-pFibro/NSpBMP-9 were lower but also similar (32.7 ± 5.3 pmol/cm² and 30.6 ± 3.7 pmol/cm², respectively).

3.6.2 Effect of PCL functionalized with different peptides on the attachment and spreading of murine multipotent C3H10T1/2 cells

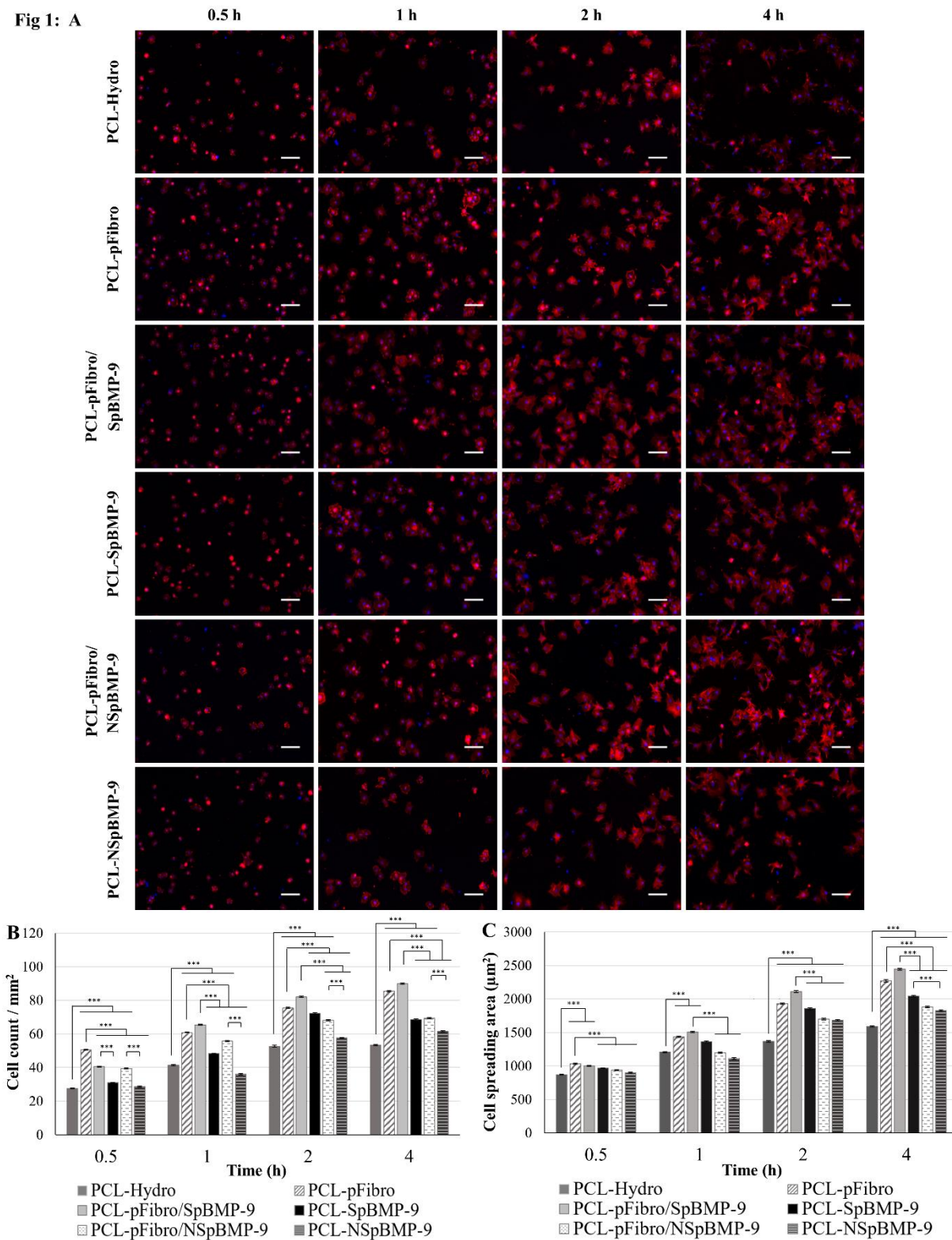


Figure 3. 1- Attachment and spreading of C3H10T1/2 cells on PCL-Hydro, PCL-pFibro, PCL-pFibro/SpBMP9, PCL-SpBMP9, PCL-pFibro/NSpBMP9 or PCL-NSpBMP9 incubated for 0.5h, 1h, 2h or 4 h in serum-free medium. **(A)** C3H10T1/2 cells attached to PCL films were stained with Rhodamine-Phalloidin to label actin cytoskeleton (F-actin, red) and DAPI to label nuclei (blue). Bar = 100 μ m (representative of 3 independent experiments). **(B)** Counting of C3H10T1/2 cells attached to PCL films. For each experimental condition, one hundred images were analysed under an epifluorescence microscope (10x objective). Results are means \pm standard errors of the mean (SEM) of three independent experiments. **(C)** Kinetics of C3H10T1/2 cell spreading. For each experimental condition eighty images were analysed under an epifluorescence microscope (40x objective). Results are means \pm SEM of three independent experiments (***) $p < 0.001$.

We first evaluated the attachment of C3H10T1/2 cells to PCL films functionalized with pFibro and/or SpBMP-9 by incubation for 0.5, 1, 2, and 4 h (Fig. 1A). Unfunctionalized hydrolysed PCL films (PCL-Hydro) were used as negative control for pFibro (PCL-pFibro) since we have shown in previous study that they were similar to those of the negative peptide bearing RGE residue (Dreville et al. 2013). Negative SpBMP-9 peptides (NSpBMP-9) were also bound to PCL film. PCL films bearing pFibro/NSpBMP-9 or NSpBMP-9 were used as negative controls for PCL films bearing pFibro/SpBMP-9 and SpBMP-9 respectively. The nuclei and actin filaments of C3H10T1/2 cells adhering to PCL films after culture for 0.5, 1, 2 and 4h were labelled (Figure 3.1A). The few cells attached to PCL-Hydro or PCL-NSpBMP-9 films were rounded, had spread very little and had unorganized actin cytoskeleton. The counts of attached cells also revealed no significant difference between the cell densities on PCL-Hydro and PCL-NSpBMP-9 films after incubation for 1, 2, or 4h (Supplementary table 1A). The C3H10T1/2 cells adhered to all other PCL films contained some actin stress fibres after 2 h of incubation. The extended cytoskeleton of cells adhering to PCL-pFibro/SpBMP-9, PCL-pFibro/NSpBMP-9, and especially PCL-pFibro, contained many actin filaments. There were significantly more C3H10T1/2 cells ($p < 0.001$) adhering to PCL film bearing pFibro/SpBMP-9 after incubation for 2 and 4 h compared to PCL-SpBMP-9, PCL-pFibro/NSpBMP-9 and PCL-NSpBMP-9 (Figure 3.1B).

However, the number of cells adhering to PCL-pFibro and PCL-pFibro/SpBMP-9 were not significantly different after incubation for 4 h (Supplementary table 1A). We checked the results shown in Fig. 3.1C by measuring the cell spreading area (Figure 3.1C). The spreading area of the few cells attached to the negative control PCL-Hydro after 2h and 4h was smaller

than those of the cells attached to all other PCL films ($p < 0.001$). The spreading areas of cells adhering to PCL-pFibro, and especially PCL-pFibro/SpBMP-9 ($p < 0.001$) were greater than those of cells attached to PCL-SpBMP-9, PCL-pFibro/NSpBMP-9 and PCL-NSpBMP-9 after incubation for both 2 h and 4 h (Figure 3.1C).

3.6.3 Effect of PCL functionalized with pFibro and/or SpBMP-9 on focal adhesion point in attached C3H10T1/2 cells

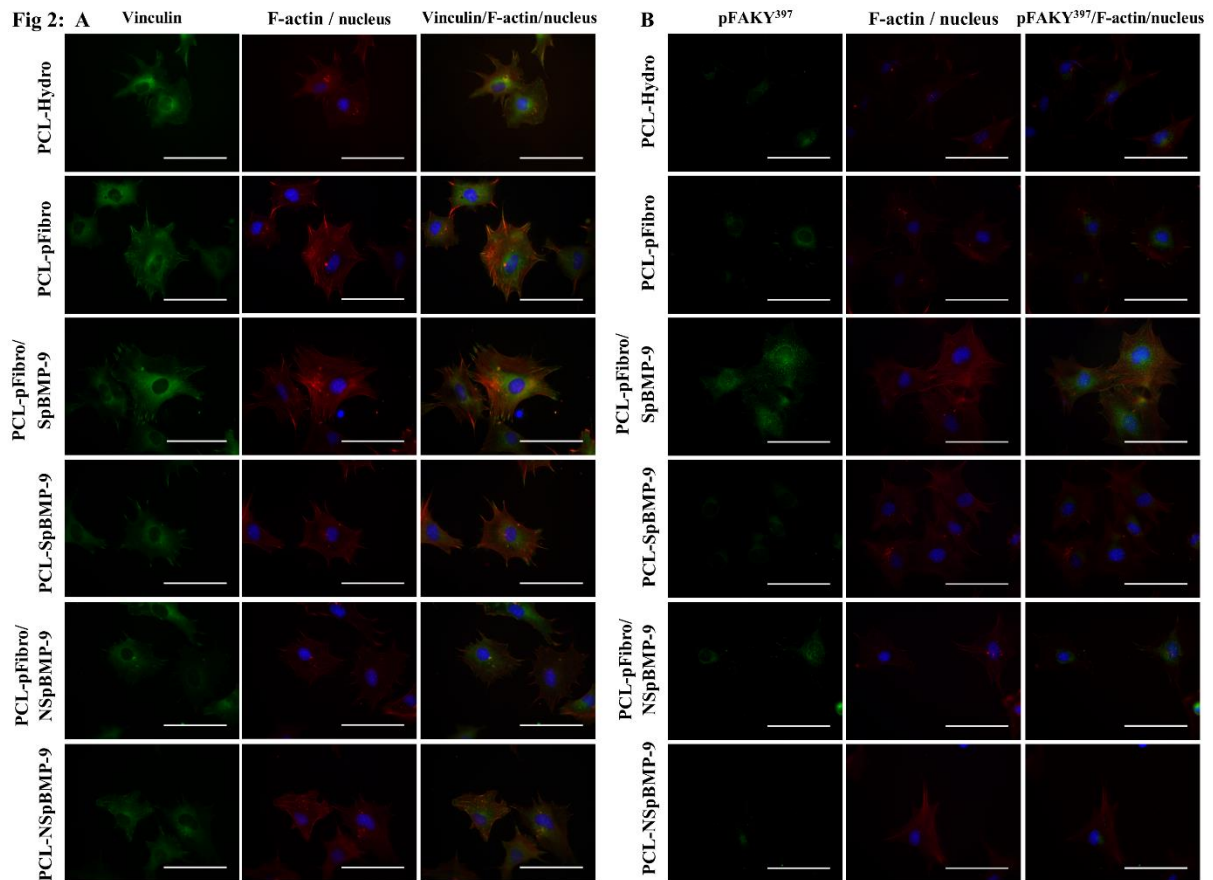


Figure 3. 2 - Focal adhesion points in C3H10T1/2 cells attached to PCL films functionalized with (PCL-pFibro, PCL-pFibro/SpBMP9, PCL-SpBMP9, PCL-pFibro/NSpBMP9 or PCL-NSpBMP9), or not functionalized (PCL-Hydro) after incubation for 4h in serum-free medium. **(A)** C3H10T1/2 cells were stained with Alexa Fluor® 594 phalloidin (F-actin, red), DAPI (nucleus; blue) and mouse anti-vinculin antibodies (green). **(B)** Cells were stained with rabbit antibodies against Y397 pFAK (green), Alexa Fluor® 594 phalloidin (F-actin, red) and DAPI (nuclei; blue). Bar = 100 μ m. Results are representative of two independent experiments.

The spreading of C3H10T1/2 cells adhering to PCL-pFibro, PCL-pFibro/SpBMP-9 differed significantly from those of cells attached to PCL-SpBMP-9, PCL-pFibro/NSpBMP-9

and PCL-NSpBMP-9. The quality of the cell attachment to PCL films was then analysed more thoroughly by studying the focal adhesion point formation by immunolabelling the structural protein vinculin (Figure 3.2). These focal adhesion points at the cell periphery connect the extracellular matrix proteins and the integrins to the cytoskeleton, indicating good cell anchorage (Geiger et al. 2001; Zaidel-Bar & Geiger 2010).

The vinculin detected in C3H10T1/2 cells attached to PCL-Hydro and PCL-NSpBMP-9 (negative controls) was essentially perinuclear and cytoplasmic, although the staining intensity was very low (Figure 3.2A). The cells adhering to PCL-SpBMP-9 and PCL-pFibro/NSpBMP-9 had thin pericytoplasmic vinculin complexes and few actin filaments. In contrast, cells adhering to PCL-pFibro and PCL-pFibro/SpBMP-9 had very well-organized cytoskeleton with vinculin in structures characteristic of focal adhesion points (Figure 3.2A). We confirmed the presence of focal adhesion points by staining cells with anti-pFAK antibodies (Y397) because focal adhesion point formation is regulated by the activation of FAK (Frame et al. 2010). FAK must be autophosphorylated at Y397 (pFAK) before it can change conformation and be recognized by the Src tyrosine kinases (Schaller & Parsons 1994). Cells attached to PCL-Hydro, PCL-NSpBMP-9 and PCL-SpBMP-9 showed only faint perinuclear labelings of pFAK (Y397) (Figure 3.2B), while pFAK was present at the periphery of cells adhering to PCL-pFibro, PCL-pFibro/SpBMP-9 and PCL-pFibro/NSpBMP-9. There was more pFAK in cells attached to PCL-pFibro/SpBMP-9 than in those on any other PCL films (Figure 3.2B).

3.6.4 Influence of PCL functionalized with pFibro and/or SpBMP-9 on the activation of the canonical Smad signaling pathway and the translocation of psmad to the nucleus

We have demonstrated in a previous study that the canonical Smad 1/5 pathway can be activated in C3H10T1/2 cells attached to PCL pFibro and treated with soluble SpBMP-9, and this phosphorylated Smad 1/5 (pSmad 1/5) is translocated to the nucleus within 4h (Beauvais, Drevelle, Lauzon, et al. 2016). We therefore checked that SpBMP-9 immobilized on PCL films could activate the Smad 1/5 pathway in murine multipotent cells (Figure 3.3A). The phosphorylated Smad 1/5 in C3H10T1/2 cells adhering to PCL films with or without functionalization after incubation for 0.5, 1, 2 or 4h was detected by Western blotting and quantified by densitometry. GAPDH was used as control.

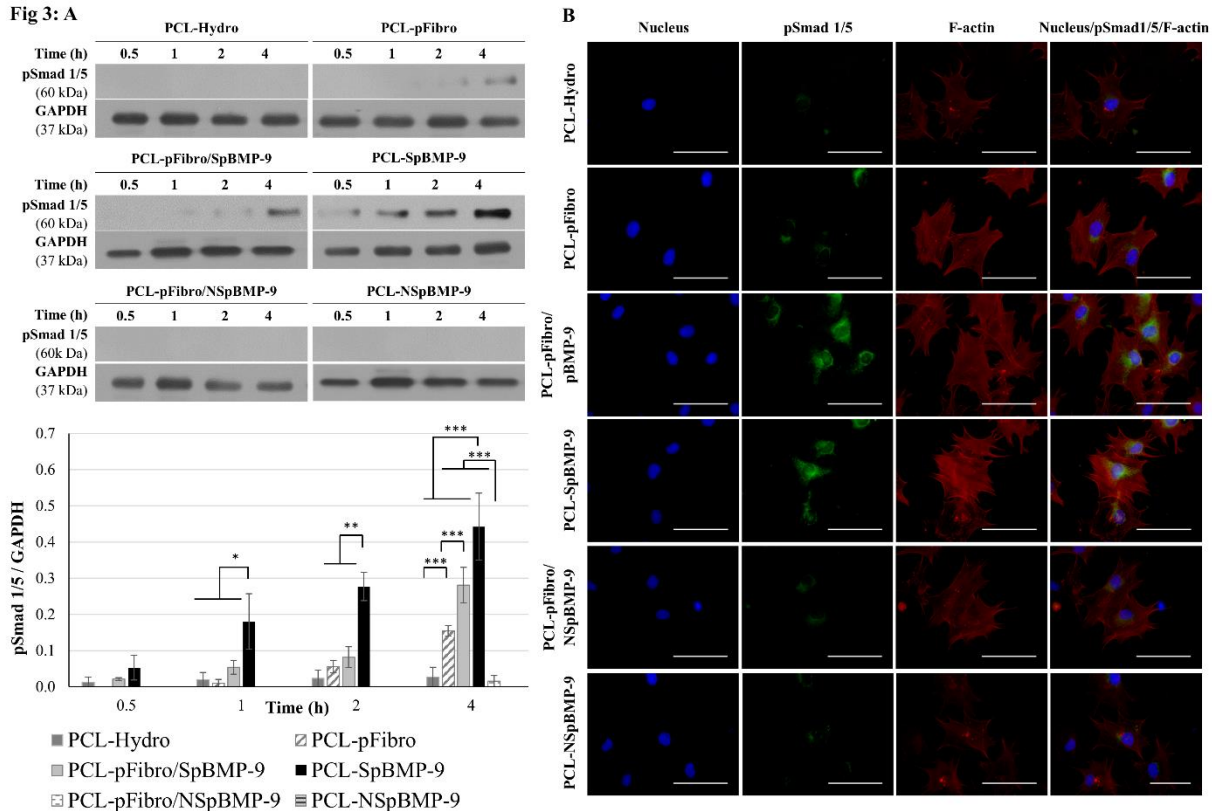


Figure 3.3 - (A) Smad1/5 phosphorylation (pSmad) in adhered C3H10T1/2 cells analysed by Western blotting and densitometry. C3H10T1/2 cells were incubated for 0.5h, 1h, 2h or 4 h in serum-free medium on PCL-Hydro, PCL-pFibro, PCL-pFibro/SpBMP9, PCL-SpBMP9, PCL-pFibro/NSpBMP9 or PCL-NSpBMP9. Results are means \pm SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **(B)** Immunolabelling of pSmad 1/5 in the nuclei of attached cells incubated for 4h in serum-free medium. C3H10T1/2 cells were stained with Alexa Fluor® 594 phalloidin (F-actin, red), DAPI (nucleus; blue) and rabbit anti-pSmad 1/5 antibodies (green). Bar = 100 μ m. This experiment is representative of two independent experiments.

Little pSmad 1/5 was detected in the lysates of cells attached to PCL-Hydro, PCL-pFibro/NSpBMP-9 or PCL-NSpBMP-9 as confirmed by densitometric analyses (Figure 3.3A). Cells attached to PCL-pFibro contained a thin band of pSmad 1/5 after incubation for 2 h, which increased slightly after 4 h, but remained significantly lower ($p < 0.001$) than that of cells attached to PCL-pFibro/SpBMP-9 or PCL-SpBMP-9 (Figure 3.3A). The cells attached to PCL 100%SpBMP-9 and PCL-pFibro/SpBMP-9 contained phosphorylated Smad 1/5 within 0.5 and 1h, which continued to increase for up to 4 h. The pSmad 1/5 band was more intense in cells attached to PCL-SpBMP-9 than in cells attached to PCL-pFibro/SpBMP-9 after 1h ($p < 0.05$), 2h ($p < 0.01$) and 4h ($p < 0.001$) (Figure 3.3A). Thus, functionalization of PCL films with both pFibro

and SpBMP-9 resulted in greater and faster activation of the canonical Smad 1/5 pathway than did PCL films bearing pFibro alone, but there was even more Smad 1/5 activation in cells attached to PCL-SpBMP-9.

We analysed the translocation of pSmad 1/5 to the nuclei of C3H10T1/2 cells attached to PCL films to confirm that the Smad signalling pathway was completely processed. Cells were stained with anti-pSmad 1/5 antibodies, while F-actin and nucleus were counterstained with phalloidin and DAPI, respectively (Figure 3.3B). Cells attached to PCL-NSpBMP-9 and PCL-pFibro/NSpBMP-9 showed basal perinuclear patterns similar to PCL-Hydro. Cells attached to PCL-pFibro appeared to contain more intense immunostaining for pSmad 1/5 than did cells attached to PCL-Hydro, PCL-NSpBMP-9 or PCL-pFibro/NSpBMP-9, but it remained perinuclear (Figure 3.3B). Only the C3H10T1/2 cells attached to PCL-pFibro/SpBMP-9 and PCL-SpBMP-9 showed strong nuclear translocation of pSmad 1/5 at 4h.

3.6.5 Early markers of cell differentiation in C3H10T1/2 cells attached to films functionalized with pFibro and/or SpBMP-9

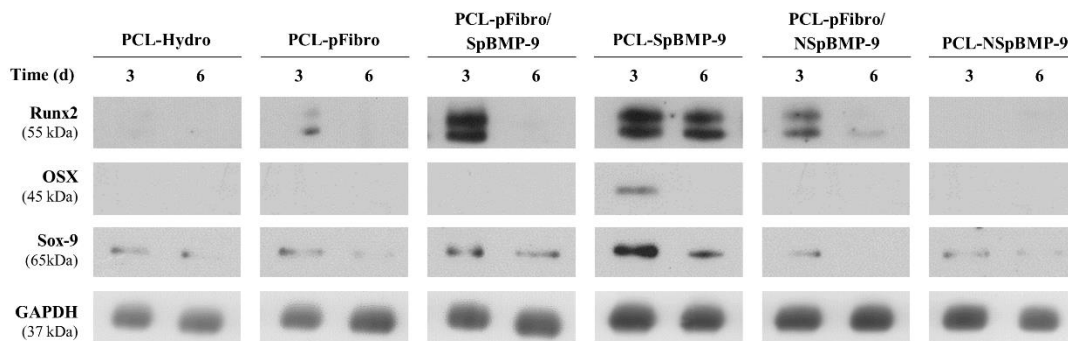


Figure 3. 4 - Differentiation of C3H10T1/2 cells attached to PCL-Hydro, PCL-pFibro, PCL-pFibro/SpBMP9, PCL-SpBMP9, PCL-pFibro/NSpBMP9 or PCL-NSpBMP9 and incubated for 3 and 6 d in medium supplemented with 1%FBS. Early osteogenic (Runx2, Osx) and chondrogenic (Sox9) markers in adhered C3H10T1/2 cells were revealed by Western blotting. This experiment is representative of three independent experiments.

Translocated pSmad 1/5 complexes bind to DNA to promote the transcription of early (Dlx5, Runx2) and late (Osx, ALP) marker genes of osteoblast differentiation (Massague et al. 2005). Since C3H10T1/2 cells are multipotent, they can become committed to more than one cell lineage (eg: chondrogenic or adipogenic). We determined the effect of PCL films

functionalized with pFibro and/or SpBMP-9 on the commitment of these stem cells to form osteoblasts (Runx2, Osx), chondroblasts (Sox9) or adipocytes (PPAR γ) by Western blotting (Figure 3.4 and Supplementary figure 1). GAPDH was used as control. PPAR γ was detected in murine 3T3-L1 preadipocytes, used as a positive control for adipocyte differentiation, and incubated for 2 d in DMEM with 10 % FBS and 0.25 μ M dexamethasone (Supplementary figure 1). We detected no PPAR γ in C3H10T1/2 cells adhering to any of the PCL films (Supplementary figure 1).

Lysates of cells attached to PCL-Hydro for 3 d contained small amounts of Sox9, which appeared to decrease after 6 d (Figure 3.4). Similar results were obtained with cells attached to PCL-Fibro, PCL-NSpBMP-9 and PCL-pFibro/NSpBMP-9. Cells adhering to PCL-pFibro/SpBMP-9 and PCL-SpBMP-9 contained more Sox9 than those of cells attached to other PCL films. However, C3H10T1/2 cells attached to PCL-SpBMP-9 contained more Sox9, especially after incubation for 3 d than those on PCL-pFibro/SpBMP-9 (Figure 3.4). No Runx2 or Osx was detected in the cells attached to PCL-Hydro or PCL-NSpBMP-9. Cells attached to PCL-pFibro or PCL-pFibro/NSpBMP-9 had some traces of Runx2 after 3 d of incubation. Cells attached to PCL-pFibro/SpBMP-9 and PCL-SpBMP-9 contained significantly more Runx2 than did those incubated under any other experimental conditions for 3 d. While Runx2 was no longer detected in cells incubated on PCL-pFibro/SpBMP-9 at 6 d, its level remained high in cells adhering to PCL-SpBMP-9 (Figure 3.4). Osx was detected only in cells attached to PCL-SpBMP-9 at 3 d (Figure 3.4).

3.7 Discussion

To improve MSC cell adhesion and differentiation, biomaterials can be functionalized with extracellular matrix (ECM) proteins and/or growth factors such as BMPs (He et al. 2008; Pryor et al. 2009; He et al. 2012). Their low cost and reliable synthesis has ensured that peptides (alone or in combination) derived from ECM proteins or BMPs are now used in the development of more and more biomaterials (Moore et al. 2011; Bilem et al. 2016; Beauvais, Drevelle, Lauzon, et al. 2016). We recently found that PCL films functionalized with pFibro plus soluble SpBMP-9 stimulated murine stem cells, rapidly activated their Smad signalling pathway, and orientated them towards osteoblastic differentiation (Beauvais, Drevelle, Lauzon, et al. 2016). The pFibro contains the RGD and PHSRN domains of fibronectin; its interaction with α 5 β 1

integrin ensures that the substrate interacts with cells, stimulating them to start polymerizing actin stress fibres (Kao et al. 2001; Hynes 2002; Nagae et al. 2012).

The present study evaluates the effect of pFibro and/or SpBMP-9 peptides immobilized on PCL film on the behaviour of murine stem cells. Specifically, we measured the adhesion capacity (number of adhered cells, cell spreading, immunostaining of pFAK and vinculin) and signalling (immunostaining and kinetics of pSmad activation) that directly influence the differentiation of C3H10T1/2 cells into the osteoblastic lineage. We also verified and evaluated the osteoinductive potential of SpBMP-9 by incorporating controls using negative NSpBMP-9 peptides. Few studies used inactive peptides especially those derived from BMPs as control to verify the efficacy and specificity of the positive molecules upon their grafting to the material (Saito et al. 2003).

Moreover, the density of the molecules immobilized on biomaterials can affect the way cells spread, adhere, and behave. Rezanian and Healy determined that the density of the peptide derived from BSP (CGGNGEPRGDTYRAY) on quartz surfaces must be at least 0.62 pmol/cm^2 to ensure that osteoblasts increase the mineralization of the matrix after 3 weeks of culture (Rezanian & Healy 2000). We have used higher pFibro peptide densities on our PCL film: $81.3 \pm 1.9 \text{ pmol/cm}^2$ on PCL-pFibro, $66.5 \pm 2.9 \text{ pmol/cm}^2$ on PCL-SpBMP-9 and $67.4 \pm 2.2 \text{ pmol/cm}^2$ on PCL-NSpBMP-9. The density of each peptide on films bearing two peptides was half of that bound alone. Few studies have evaluated the densities of peptides immobilized simultaneously on biomaterials on the quality of cell adhesion (Beauvais et al. 2016; Drevelle et al. 2010; Comisar et al. 2011; Brinkerhoff & Linderman 2005).

We found that the density of peptides bound to film appeared to influence the morphology and adhesion of C3H10T1/2 cells. Thus, 1.4-times more stem cells adhered to PCL-pFibro ($81.3 \pm 1.9 \text{ pmol of peptides/cm}^2$) after incubation for only 2 and 4 h than did to PCL-Hydro, and the cell spreading area was also greater. Fewer cells adhered to films bearing both pFibro and NSpBMP-9, and these cells had some focal adhesion points that were less well organized than those of cells adhering to films bearing pFibro alone or combined with SpBMP-9. We saw no significant difference between the numbers of cells adhering to PCL-pFibro and PCL-pFibro/SpBMP-9 or in their spreading. The cells formed highly organized cytoskeleton and numerous focal adhesion points at their peripheries. The focal adhesion points, which connect integrins to the cell cytoskeleton (Zaidel-Bar & Geiger 2010), ensure that cells are

firmly anchored to the matrix and the transmission of survival signals (Watabe et al. 2011). In contrast, the adhesion, cytoskeletal organization and FAK activation of cells adhering to PCL-SpBMP-9 were limited.

The activity of immobilized complex biomolecules could be modified by the process of immobilization, reducing the effectiveness of the biomaterial-biomolecule combination and preventing it from interacting properly with the cells (Drevelle & Faucheux 2013). We verified that immobilized SpBMP-9 retained its ability to activate Smad pathways. The canonical Smad 1/5 pathway of murine multipotent stem cells adhered to PCL-SpBMP-9 was activated after only 0.5 h. C3H10T1/2 cells adhering to PCL-SpBMP-9 contained more phosphorylated Smad 1/5 than did cells adhering to other PCL films. The combination of pFibro and SpBMP-9 on PCL films amplified the activation of the Smad pathway stimulated by pFibro alone, particularly after incubation for 4h, without reaching the level of activation induced by PCL-SpBMP-9. The amounts of pSmad 1/5 detected in cells attached to PCL-pFibro after 4h of incubation agreed well with our previous findings (Beauvais, Drevelle, Lauzon, et al. 2016). This activation might be due to crosstalk between pFibro, its integrin $\alpha 5 \beta 1$ and BMP receptors (Tian et al. 2012). The canonical Smad signalling pathway of cells adhering to PCL-pFibro/SpBMP-9 films was also significantly more activated than that of cells attached to PCL-pFibro/NSpBMP-9. To our knowledge, no study has paid attention to the activation of the Smad canonical pathway in stem cells attached to biomaterials bearing both adhesive and BMP peptides, although it is the main signalling pathway activated by BMPs and is essential for osteogenesis. The pSmad 1/5 must also be translocated to the nucleus in order to trigger the transcription of genes encoding proteins involved in osteoblast differentiation (eg: Runx2) (Matsubara et al. 2008; Ducy et al. 1997). The nuclear pSmad 1/5 translocation was only detected in cells adhering to PCL-SpBMP-9 and PCL-pFibro/SpBMP-9.

We then turned to the effect of peptides co-immobilization on PCL films on the longer term (3 and 6 d) differentiation of C3H10T1/2 cells, as these cells are multipotent, capable of self-renewing and can differentiate into osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages *in vitro* and *in vivo* (Dominici et al. 2006; Ullah et al. 2015; Wagner et al. 2005). Sox9 is an early marker of differentiation that is essential for chondrogenesis (Zhao et al. 1997), while PPAR γ commits MSCs to the adipogenic lineage (James 2013). Unlike most studies that have evaluated only one phenotype, we tested for osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineage of

C3H10T1/2 cells to ensure that the biomaterial accurately controls the behaviour of stem cells (Moore et al. 2011; Bilem et al. 2016; He et al. 2008). We found no PPAR γ in the cells adhering to any of the PCL films tested, while Sox9 was present in cells under all conditions, perhaps because Sox9 is produced by all mesenchymal progenitors in addition to being essential for chondrogenesis (Akiyama et al. 2005). It thus intervenes upstream of the osteo-chondroblastic specialization. Nevertheless, cells adhering to PCL-SpBMP-9 and PCL-pFibro/SpBMP-9 contained more Runx2 protein than did cells under all other experimental conditions. Moore *et al.* incubated hBMSCs for 3 d on immobilized pBMP-2 at peptide densities similar to ours (80-120 pmol/cm²) and found increased expression of Runx2 (Moore et al. 2011). Bilem *et al.* found that hBMSCs incubated for 4 weeks on glass surfaces bearing both GRGDS and BMP-2 peptides (0.7 and 1.0 pmol/mm² respectively) expressed Runx2 as shown by immunolabelling (Bilem et al. 2016). It is however difficult to compare the results of the present study with those of Bilem *et al.* or Moore *et al.*, since they used different cell types, adhesive and BMP peptides (Bilem et al. 2016; Moore et al. 2011).

In addition, only C3H10T1/2 cells attached to PCL-SpBMP-9 produced the Osx protein. Thus, SpBMP-9 immobilized on PCL films was osteoinductive but did not induce stem cells to differentiate into adipocytes.

Our comparison of the films bearing pFibro/SpBMP-9 (PCL-pFibro/SpBMP-9) and pFibro/inactive SpBMP-9 (PCL-pFibro/NSpBMP-9) indicates that there were potential crosstalks between the pFibro and SpBMP-9 receptors that enhanced both the adhesion and osteoblastic commitment of murine stem cells. The PCL-pFibro/SpBMP-9 complex also resulted in the synthesis of less early chondroblastic markers than did PCL-SpBMP-9 alone.

We have shown for the first time that a peptide derived from BMP-9 co-immobilized with an 18-residue peptide derived from the fibronectin can enhance simultaneously cell adhesion and stem cell commitment to osteoblastic lineage without adipogenic differentiation.

3.8 Conclusion

Cells adhering to both PCL-SpBMP-9 and PCL-pFibro/SpBMP-9 had improved activation and translocation of Smad 1/5 and enhanced Runx2 expression. But cells adhered better to PCL-pFibro/SpBMP-9 than to PCL-SpBMP-9 and had a better organized cytoskeleton. Our results from cells attached to PCL-NSpBMP-9 confirmed the functionality and

effectiveness of SpBMP-9. We believe that surface material functionalized with pFibro and SpBMP-9 offer a promising strategy to the production of scaffolds for bone and tissue engineering applications.

3.9 Acknowledgments

We thank Dr Owen Parkes for editing the English text. This research was supported through a Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada program (grant number 298359).

CHAPITRE 4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

4.1 Conclusion

Ce projet de maîtrise a mis en évidence l'impact de la co-immobilisation, sur des films de polycaprolactone (PCL), d'un peptide d'adhésion dérivé de la fibronectine (pFibro) et d'un peptide dérivé de la BMP-9 (SpBMP-9), sur la réponse cellulaire des MSCs murines C3H10 T1/2. Cette co-localisation a permis d'étudier plus précisément les relations croisées existant entre les intégrines reconnaissant le pFibro et les récepteurs du SpBMP-9. L'utilisation d'un peptide négatif au SpBMP-9, le NSpBMP-9, a également permis de vérifier l'efficacité du SpBMP-9.

Tout d'abord, l'étude sur l'adhésion cellulaire a montré que la co-localisation des peptides pFibro et SpBMP-9 sur les films de PCL favoriserait l'étalement cellulaire et la formation de points focaux d'adhésion par les MSCs murines. Contrairement au PCL-pFibro/NSpBMP-9, les MSCs adhérentes au PCL-pFibro/SpBMP-9 étaient significativement plus nombreuses et présentaient un cytosquelette plus étendu avec de nombreux points focaux d'adhésion après 2 et 4h d'incubation sans sérum. Ces résultats étaient similaires (aucune différence significative) à ceux observés sur les films de PCL fonctionnalisés avec une densité de peptide pFibro deux fois plus élevée (PCL-pFibro). De plus, le peptide SpBMP-9 a conservé ses propriétés ostéoinductives lorsqu'il était immobilisé sur les films de PCL. En effet, les films de PCL fonctionnalisés avec le SpBMP-9 (PCL-SpBMP-9 et PCL-pFibro/SpBMP-9) ont induit l'activation et la translocation de la voie canonique des Smad. Les C3H10 T1/2 adhérentes au PCL-SpBMP-9 exprimaient un niveau de Smad 1/5 phosphorylées supérieur à ceux de cellules adhérentes aux autres films de PCL entre 1h et 4h d'incubation. De plus, les films de PCL-pFibro/SpBMP-9 et 100%SpBMP-9 étaient les seuls à permettre une translocation des pSmad 1/5 après 4h d'incubation. Finalement, ce projet de recherche a analysé l'impact de la co-fonctionnalisation des films de PCL sur l'engagement des MSCs vers différentes voies de spécialisation cellulaire. Le greffage du peptide SpBMP-9 sur les films de PCL (PCL-SpBMP-9 et PCL-pFibro/SpBMP-9) a renforcé l'expression de Runx2, un facteur de transcription essentiel dans la différenciation ostéoblastique, sans induire la spécialisation des MSCs murines en adipocytes.

Les relations croisées entre les intégrines reconnaissant le pFibro et les récepteurs du SpBMP-9 ont amélioré à la fois l'adhésion et la différenciation ostéoblastique des MSCs murines. Ainsi, le développement de films de PCL co-fonctionnalisés avec les peptides pFibro et SpBMP-9 semble être une approche prometteuse pour des applications d'ingénierie tissulaire osseuse.

4.2 Perspectives

Le principal objectif de ce projet de maîtrise était de mieux comprendre l'influence d'un biomatériau co-fonctionnalisé avec des peptides d'adhésion (pFibro) et des peptides dérivés de la BMP-9 (SpBMP-9) sur la réponse cellulaire de MSCs murines. Toutefois, les résultats obtenus suscitent de nombreuses interrogations et ouvrent de nouvelles perspectives de recherche.

4.2.1 Influence du biomatériau co-fonctionnalisé sur d'autres types de cellules souches

L'ensemble de cette étude a été réalisé sur des cellules souches murines. Étant donné le potentiel d'adhésion cellulaire et d'induction ostéoblastique des films de PCL co-fonctionnalisé avec le pFibro et SpBMP-9, il serait intéressant de vérifier leurs incidences sur d'autres types de cellules souches comme les MSCs humaines ou les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSC). Le tissu adipeux constitue une source très abondante de cellules souches mésenchymateuses qui possèdent des propriétés similaires à celles retrouvées dans la moelle osseuse (Grayson et al. 2015). La facilité d'accès et l'abondance relative des ADSC sont des avantages pratiques non négligeables, ce qui en fait un candidat de choix pour les applications de thérapie cellulaire. Cependant, des types cellulaires différents ne présentent pas nécessairement les mêmes récepteurs transmembranaires à leur surface, influençant considérablement les interactions et l'impact du matériau biomimétique. Vohra *et al.* ont comparé la capacité d'adhésion de deux lignées d'ostéosarcomes (MG-63 et Saos-2) avec celle de MSCs humaines sur des matrices d'hydroxyapatite (HA) revêtues avec de la fibronectine ou du collagène-I (Vohra et al. 2008). MG-63 et Saos-2 se sont liées plus efficacement avec la fibronectine, tandis que les MSCs ont préféré l'hydroxyapatite revêtu de collagène-I. En outre, le profil d'expression des intégrines différait selon le type cellulaire analysé. Les MSCs ont

montré des niveaux d'expression plus élevés de la sous-unité d'intégrine $\alpha 2$. De plus, la liaison à la fibronectine a été médiée par les sous-unités intégrine $\alpha 5$ et αv pour les lignées d'ostéosarcome, alors que seules les intégrines αv ont été utilisées par les MSCs (Vohra et al. 2008).

4.2.2 Influence du matériau co-fonctionnalisé sur d'autres voies de signalisation

Dans le cadre de ce projet de maîtrise sur le développement d'un biomatériau co-fonctionnalisé par les peptides pFibro et SpBMP-9, seule la voie canonique des Smad a été évaluée. Il s'agit en effet de la principale voie de signalisation activée par les BMPs. Or, d'autres voies de signalisation peuvent influencer la réponse cellulaire lors de la stimulation par les BMPs, tel que la voie des MAPKs (Senta et al. 2009). Cette voie de signalisation se divise en 3 cascades menant à la phosphorylation d'ERK1/2, p38 et JNK. Ces trois composantes peuvent alors être transloquées au noyau et interagir avec différents facteurs afin de contrôler la transcription de gènes spécifiques (Liu et al. 2007). Les 3 cascades de signalisation n'ont pas nécessairement le même impact sur la différenciation ostéoblastique des cellules. Ainsi, l'inhibition de p38 chez des C3H10 T1/2 infectées par AdBMP-9 a induit une diminution de la synthèse d'ALP, alors que l'effet inverse a été observé suite à l'inhibition de ERK1/2 et JNK chez les préostéoblastes murins MC3T3-E1 (Xu et al. 2012; Lauzon et al. 2014). En outre, des relations croisées existeraient également entre les voies de signalisation Smad et MAPK permettant le contrôle de la différenciation ostéoblastique des cellules. Ainsi, en phosphorylant la région de liaison de Smad1, ERK1/2 régulerait la voie canonique des Smad en empêchant la formation du complexe Smad 1/Smad4 et sa translocation au noyau (Kretschmar et al. 1999).

4.2.3 Stimulation des MSCs adhérentes par IGF-2

Les BMPs sont les facteurs de croissance aux propriétés ostéinductives accrues et possèdent un rôle clé dans les mécanismes physiologiques de réparation/régénération osseuse. Cependant, de nombreux autres facteurs interviennent lors de ces processus et peuvent agir en synergie avec les BMPs afin d'améliorer la différenciation ostéoblastique des MSCs et des cellules osseuses. Une récente étude a montré qu'IGF-2 permettait d'augmenter l'activité de l'ALP induite par la BMP-9 chez les MC3T3-E1 (Lauzon et al. 2014). Tout comme les BMPs, la réponse ostéogénique induite par d'autres types de facteur de croissance peut être améliorée

en ciblant des intégrines spécifiques. Ainsi, en bloquant la reconnaissance des sous-unités d'intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$, la synthèse d'IGF-2 par les MSCs humaine a été diminuée (Hamidouche et al. 2010). De plus, par l'intermédiaire des voies FAK et PI3K, la présence d'intégrines $\alpha 5 \beta 1$ fonctionnelles à la surface des hMSCs a permis d'améliorer la signalisation cellulaire induite par IGF-2 (Hamidouche et al. 2010). Dans ce projet de maîtrise, nous avons démontré que les films de PCL co-fonctionnalisés par les peptides pFibro, ciblant les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et SpBMP-9, permettaient d'améliorer l'adhésion cellulaire et la différenciation ostéoblastique des MSCs. Ainsi, il serait très intéressant d'évaluer l'impact d'une stimulation par IGF-2 sur la réponse cellulaire de MSCs adhérentes aux films de PCL co-fonctionnalisés avec pFibro et SpBMP-9. Une étude plus approfondie des effets dose IGF-2 et/ou SpBMP-9 et des cinétiques de stimulation serait alors nécessaire afin de sélectionner les conditions optimales (dose et temps de stimulation) permettant de potentialiser la différenciation ostéoblastique des cellules souches.

4.2.4 Matériau biomimétique en 3D co-fonctionnalisé

La plupart des études sur le développement de matériaux biomimétique utilisant des molécules bioactives sont effectuées en culture 2D. Certains de ces systèmes sont actuellement utilisés pour recouvrir les surfaces de prothèses (Rammelt 2014). Toutefois, les structures tridimensionnelles complexes des os, retrouvées *in vivo*, ne peuvent être mimées correctement par des systèmes 2D. Afin de permettre leur utilisation concrète dans des applications de réparation/régénération osseuse, le développement de matériaux biomimétiques en 3D reste essentiel. Toutefois, la conception de biomatériaux tridimensionnels appliqués à la régénération osseuse comporte de nombreux défis. Les niveaux de porosité du matériau 3D doivent être scrupuleusement étudiés afin de favoriser l'ostéogénèse et de mimer la structure physiologique des os à remplacer (Karageorgiou & Kaplan 2005). Des techniques permettant l'approvisionnement en oxygène et en nutriments et la colonisation complète du matériau par les MSCs ou cellules osseuses sont alors requises (Kuboki et al. 1998).

Ce projet de maîtrise a permis de confirmer le potentiel ostéogénique induit par la co-immobilisation de peptides d'adhésion et de peptides dérivés de BMPs sur des biomatériaux 2D. Cette hypothèse est appuyée par de nombreuses autres études récentes analysant l'influence de différentes combinaisons de peptides (Moore et al. 2011; He et al. 2008; Bilem et al. 2016). Cette stratégie de greffage pourrait être appliquée à des échafaudages biomimétiques en 3D afin

de potentialiser leurs activités adhésives et ostéoinductrices. Toutefois, les peptides utilisés dans ce projet de maîtrise ne seront pas nécessairement ceux greffés sur le matériau biomimétique en 3D. En effet, les composantes cellulaires permettant l'adhésion aux biomatériaux diffèrent considérablement entre les structures 2D et 3D (Marquis et al. 2009). Le comportement cellulaire de MSCs humaines cultivées sur des surfaces en 2D ou des structures 3D de polytéraphthalate d'éthylène a été comparé (Grayson et al. 2004). Des niveaux importants de protéines matricielles (Collagène de type I et IV, fibronectine et laminine) ont été synthétisés sous la forme de fibres par les cellules cultivées en 3D. Des quantités plus faibles de ces mêmes protéines ont été synthétisées par les hMSCs cultivées en 2D, se retrouvant principalement au niveau de leur cytoplasme sous une forme peu organisée. En outre, l'abondance et le type d'intégrines exprimées par les cellules dépendaient grandement de l'environnement 2D ou 3D dans lequel elles étaient cultivées. Seule la culture 2D a permis l'expression de l'intégrine $\alpha v \beta 3$ par les hMSCs, tandis qu'un niveau d'expression supérieur d'intégrines $\alpha 2 \beta 1$ a été décelé dans les cellules cultivées sur les structures 3D comparativement aux lamelles en 2D (Grayson et al. 2004).

ANNEXE A – SUPPLEMENTARY TABLE

Supplementary table 1: Differences (Tukey-Kramer test) between treated PCL films.

A. C3H10T1/2 cells adhering to PCL films.					
Number of adhering cells					
0.5 h		1 h		2 h	
T1-T2	***	T1-T2	***	T1-T2	***
T1-T3	***	T1-T3	***	T1-T3	***
T1-T4	***	T1-T4	***	T1-T4	***
T1-T5	***	T1-T5	***	T1-T5	***
T1-T6	**	T1-T6	NS	T1-T6	NS
T2-T3	***	T2-T3	NS	T2-T3	***
T2-T4	***	T2-T4	***	T2-T4	NS
T2-T5	***	T2-T5	***	T2-T5	***
T2-T6	***	T2-T6	***	T2-T6	***
T3-T4	***	T3-T4	***	T3-T4	***
T3-T5	NS	T3-T5	***	T3-T5	***
T3-T6	***	T3-T6	***	T3-T6	***
T4-T5	***	T4-T5	***	T4-T5	***
T4-T6	NS	T4-T6	***	T4-T6	***
T5-T6	***	T5-T6	***	T5-T6	***

B. Spreading of C3H10T1/2 cells adhering to PCL film.					
Cells spreading area (μm^2)					
0.5 h		1 h		2 h	
T1-T2	***	T1-T2	***	T1-T2	***
T1-T3	***	T1-T3	***	T1-T3	***
T1-T4	**	T1-T4	*	T1-T4	***
T1-T5	**	T1-T5	NS	T1-T5	***
T1-T6	NS	T1-T6	NS	T1-T6	***
T2-T3	NS	T2-T3	NS	T2-T3	***
T2-T4	***	T2-T4	NS	T2-T4	NS
T2-T5	***	T2-T5	*	T2-T5	**
T2-T6	***	T2-T6	**	T2-T6	***
T3-T4	NS	T3-T4	**	T3-T4	***
T3-T5	NS	T3-T5	***	T3-T5	***
T3-T6	***	T3-T6	***	T3-T6	***
T4-T5	NS	T4-T5	NS	T4-T5	NS
T4-T6	NS	T4-T6	NS	T4-T6	NS
T5-T6	NS	T5-T6	NS	T5-T6	NS

(NS $p > 0.5$; * $p < 0.5$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$)

T1: PCL-Hydro

T3: PCL-pFibro/SpBMP-9

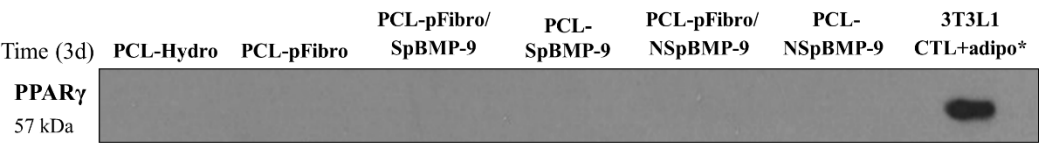
T5: PCL-pFibro/NSpBMP-9

T2: PCL-pFibro

T4: PCL-SpBMP-9

T6: PCL-NSpBMP-9

ANNEXE B – SUPPLEMENTARY FIGURE



*3T3-L1 CTL+adipo: 2 d post-confluence in DMEM/10% FBS/0.25 μ M Dexamethasone on PS.

Supplementary figure 1: Expression of transcription factor PPAR γ (adipocyte differentiation)

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Ai-Aql, Z.S. et al., 2008. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *Journal of dental research*, 87(2), pp.107–118.
- Akiyama, H. et al., 2005. Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(41), pp.14665–14670. Available at: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0504750102>.
- Akiyama, H. et al., 2002. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes & development*, 16(21), pp.2813–2828.
- Alarcon, C. et al., 2009. Nuclear CDKs drive Smad transcriptional activation and turnover in BMP and TGF-beta pathways. *Cell*, 139(4), pp.757–769.
- Alford, A.I., Kozloff, K.M. & Hankenson, K.D., 2015. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 65, pp.20–31. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272515001296>.
- Alkhiary, Y.M. et al., 2005. Enhancement of experimental fracture-healing by systemic administration of recombinant human parathyroid hormone (PTH 1-34). *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 87(4), pp.731–741.
- van Amerongen, R. & Nusse, R., 2009. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development (Cambridge, England)*, 136(19), pp.3205–3214.
- Anderson, H.C., 2003. Matrix vesicles and calcification. *Current rheumatology reports*, 5(3), pp.222–226.
- André, J. et al., 2008. Histologie : les tissus. Available at: <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP1/POLY.Chp.5.2.3.html>.
- Aono, A. et al., 1995. Potent ectopic bone-inducing activity of bone morphogenetic protein-4/7 heterodimer. *Biochemical and biophysical research communications*, 210(3), pp.670–677.
- Aragon, E. et al., 2011. A Smad action turnover switch operated by WW domain readers of a phosphoserine code. *Genes & development*, 25(12), pp.1275–1288.
- Aro, H.T. et al., 2011. Recombinant human bone morphogenetic protein-2: a randomized trial in open tibial fractures treated with reamed nail fixation. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 93(9), pp.801–808.
- Aspenberg, P. et al., 2010. Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. *Journal of bone and mineral research*, 25(2), pp.404–414. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19594305>.
- Barth, H.D. et al., 2011. Characterization of the effects of x-ray irradiation on the hierarchical structure and mechanical properties of human cortical bone. *Biomaterials*, 32(34), pp.8892–8904. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.08.013>.
- Beauvais, S., Dreville, O., Jann, J., et al., 2016. Interactions between bone cells and biomaterials: An update. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 8, pp.227–263.
- Beauvais, S., Dreville, O., Lauzon, M.-A., et al., 2016. Modulation of MAPK signalling by immobilized adhesive peptides: Effect on stem cell response to BMP-9-derived peptides. *Acta biomaterialia*, 31, pp.241–251.
- Becker, A.J., McCulloch, E.A. & Till, J.E., 1963. Cytological demonstration of the clonal

- nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*, 197, pp.452–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13970094>.
- Bellis, S.L., 2011. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*, 32(18), pp.4205–4210. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961211001815>.
- Bendall, A.J. & Abate-Shen, C., 2000. Roles for Msx and Dlx homeoproteins in vertebrate development. *Gene*, 247(1–2), pp.17–31.
- Bergeron, E. et al., 2007. Differentiation of preosteoblasts using a delivery system with BMPs and bioactive glass microspheres. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 18(2), pp.255–263.
- Bergeron, E. et al., 2009. Murine Preosteoblast Differentiation Induced by a Peptide Derived from Bone Morphogenetic Proteins-9. *Tissue Engineering Part A*, 15(11), pp.3341–3349. Available at: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2009.0189>.
- Bergeron, E. et al., 2012. The evaluation of ectopic bone formation induced by delivery systems for bone morphogenetic protein-9 or its derived peptide. *Tissue engineering. Part A*, 18(3–4), pp.342–352.
- Bertassoni, L.E. & Swain, M. V., 2014. The contribution of proteoglycans to the mechanical behavior of mineralized tissues. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 38, pp.91–104. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1751616114001726>.
- Bessa, P.C., Casal, M. & Reis, R.L., 2008. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts). *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(1), pp.1–13. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/term.63>.
- Bi, W. et al., 2001. Haploinsufficiency of Sox9 results in defective cartilage primordia and premature skeletal mineralization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), pp.6698–6703.
- Bi, Y. et al., 2005. Extracellular matrix proteoglycans control the fate of bone marrow stromal cells. *The Journal of biological chemistry*, 280(34), pp.30481–30489.
- Bidanset, D.J. et al., 1992. Regulation of cell substrate adhesion: effects of small galactosaminoglycan-containing proteoglycans. *The Journal of cell biology*, 118(6), pp.1523–1531.
- Bilem, I. et al., 2016. RGD and BMP-2 mimetic peptide crosstalk enhances osteogenic commitment of human bone marrow stem cells. *Acta biomaterialia*, 36, pp.132–142.
- Bishop, G.B. & Einhorn, T.A., 2007. Current and future clinical applications of bone morphogenetic proteins in orthopaedic trauma surgery. *International Orthopaedics*, 31(6), pp.721–727.
- Bouet, G. et al., 2015. In vitro three-dimensional bone tissue models: from cells to controlled and dynamic environment. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 21(1), pp.133–156.
- Boyce, B.F., Yao, Z. & Xing, L., 2009. Osteoclasts have multiple roles in bone in addition to bone resorption. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 19(3), pp.171–180.
- Boyle, W.J., Simonet, W.S. & Lacey, D.L., 2003. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 423(6937), pp.337–342. Available at: <http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/nature01658>.
- Brazil, D.P. et al., 2015. BMP signalling: agony and antagonism in the family. *Trends in Cell Biology*, 25(5), pp.249–264. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0962892414002141>.

- Brinkerhoff, C.J. & Linderman, J.J., 2005. Integrin dimerization and ligand organization: key components in integrin clustering for cell adhesion. *Tissue engineering*, 11(5–6), pp.865–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15998226>.
- Bruzzaniti, A. & Baron, R., 2006. Molecular regulation of osteoclast activity. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 7(1–2), pp.123–139.
- Burkus, J.K. et al., 2003. Is INFUSE bone graft superior to autograft bone? An integrated analysis of clinical trials using the LT-CAGE lumbar tapered fusion device. *Journal of spinal disorders & techniques*, 16(2), pp.113–122.
- Burkus, J.K. et al., 2004. The effectiveness of rhBMP-2 in replacing autograft: an integrated analysis of three human spine studies. *Orthopedics*, 27(7), pp.723–728. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15315042>.
- Campbell, I.D. & Humphries, M.J., 2011. Integrin structure, activation, and interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(3).
- Canalis, E., Giustina, A. & Bilezikian, J.P., 2007. Mechanisms of anabolic therapies for osteoporosis. *The New England journal of medicine*, 357(9), pp.905–916.
- Cao, X. & Chen, D., 2005. The BMP signaling and in vivo bone formation. *Gene*, 357(1), pp.1–8.
- Capulli, M., Paone, R. & Rucci, N., 2014. Osteoblast and osteocyte: Games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 561, pp.3–12. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2014.05.003>.
- Carreira, A.C.O. et al., 2015. Bone Morphogenetic Proteins: Promising Molecules for Bone Healing, Bioengineering, and Regenerative Medicine. *Vitamins and Hormones*, 99, pp.293–322.
- Carvalho, R.S. et al., 2003. Selective adhesion of osteoblastic cells to different integrin ligands induces osteopontin gene expression. *Matrix Biology*, 22(3), pp.241–249. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0945053X03000386>.
- Chen, J., Salas, A. & Springer, T.A., 2003. Bistable regulation of integrin adhesiveness by a bipolar metal ion cluster. *Nature structural biology*, 10(12), pp.995–1001.
- Chen, Y. & Webster, T.J., 2009. Increased osteoblast functions in the presence of BMP-7 short peptides for nanostructured biomaterial applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 91(1), pp.296–304.
- Cheng, H. et al., 2003. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am*, 85(AA), pp.1544–1552.
- Cheng, H. et al., 2003. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 85–A(8), pp.1544–1552.
- Cho, Y.-D. et al., 2012. Wnt3a stimulates Mepe, matrix extracellular phosphoglycoprotein, expression directly by the activation of the canonical Wnt signaling pathway and indirectly through the stimulation of autocrine Bmp-2 expression. *Journal of cellular physiology*, 227(6), pp.2287–2296.
- Choong, C. et al., 2012. Optimization of poly(epsilon-caprolactone) surface properties for apatite formation and improved osteogenic stimulation. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 100(2), pp.353–361.
- Chua, C.C. et al., 2002. TGF-beta1 inhibits multiple caspases induced by TNF-alpha in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Biochimica et biophysica acta*, 1593(1), pp.1–8.
- Civitelli, R., 2008. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Archives of biochemistry and biophysics*, 473(2), pp.188–192.

- Clarke, B., 2008. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 3 Suppl 3, pp.131–139.
- Collier, J.H. & Segura, T., 2011. Evolving the use of peptides as components of biomaterials. *Biomaterials*, 32(18), pp.4198–4204.
- Colnot, C., 2009. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 24(2), pp.274–282.
- Colnot, C., Huang, S. & Helms, J., 2006. Analyzing the cellular contribution of bone marrow to fracture healing using bone marrow transplantation in mice. *Biochemical and biophysical research communications*, 350(3), pp.557–561.
- Comisar, W.A., Mooney, D.J. & Linderman, J.J., 2011. Integrin organization: Linking adhesion ligand nanopatterns with altered cell responses. *Journal of Theoretical Biology*, 274(1), pp.120–130. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtbi.2011.01.007>.
- Copp, D.H. & Cheney, B., 1962. Calcitonin-a hormone from the parathyroid which lowers the calcium-level of the blood. *Nature*, 193, pp.381–382.
- Croce, J.C. & McClay, D.R., 2006. The canonical Wnt pathway in embryonic axis polarity. *Seminars in cell & developmental biology*, 17(2), pp.168–174.
- Cypher, T.J. & Grossman, J.P., 1996. Biological principles of bone graft healing. *Journal of Foot and Ankle Surgery*, 35(5), pp.413–417. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1067-2516\(96\)80061-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1067-2516(96)80061-5).
- Dai, Z. et al., 2014. Integrin $\alpha\beta3$ mediates the synergetic regulation of core-binding factor $\alpha1$ transcriptional activity by gravity and insulin-like growth factor-1 through phosphoinositide 3-kinase signaling. *Bone*, 69, pp.126–132. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328214003573>.
- Datta, H.K. et al., 2008. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*, 61(5), pp.577–587. Available at: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.2007.048868>.
- Dekel, S., Lenthall, G. & Francis, M.J., 1981. Release of prostaglandins from bone and muscle after tibial fracture. An experimental study in rabbits. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 63–B(2), pp.185–189.
- Destaing, O., 2003. Podosomes Display Actin Turnover and Dynamic Self-Organization in Osteoclasts Expressing Actin-Green Fluorescent Protein. *Molecular Biology of the Cell*, 14(2), pp.407–416. Available at: <http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E02-07-0389>.
- Dimitriou, R. et al., 2011. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: A systematic review. *Injury*, 42, pp.S3–S15. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002013831100252X>.
- Dominici, M. et al., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), pp.315–317.
- Drevelle, O. et al., 2013. Effect of BMP-2 and/or BMP-9 on preosteoblasts attached to polycaprolactone functionalized by adhesive peptides derived from bone sialoprotein. *Biomaterials*, 34(4), pp.1051–1062.
- Drevelle, O. et al., 2010. Effect of functionalized polycaprolactone on the behaviour of murine preosteoblasts. *Biomaterials*, 31(25), pp.6468–6476. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961210006289>.
- Drevelle, O., 2013. *INFLUENCE D'UN FILM DE POLYCAPROLACTONE FONCTIONNALISÉ PAR DES PEPTIDES D'ADHÉSION SUR LA RÉPONSE DE*

PRÉOSTÉOBLASTES À LA BMP-2 ET À LA BMP-9. UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE.

- Drevelle, O. & Fauchoux, N., 2013. Biomimetic materials for controlling bone cell responses. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)*, 5, pp.369–395.
- Dubash, A.D. et al., 2009. Chapter 1. Focal adhesions: new angles on an old structure. *International review of cell and molecular biology*, 277, pp.1–65.
- Ducy, P. et al., 1997. Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation. *Cell*, 89(5), pp.747–754. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867400802573>.
- Dufour, C., Holy, X. & Marie, P.J., 2008. Transforming growth factor-beta prevents osteoblast apoptosis induced by skeletal unloading via PI3K/Akt, Bcl-2, and phospho-Bad signaling. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 294(4), pp.E794-801.
- Dumas, A. et al., 2006. The influence of processes for the purification of human bone allografts on the matrix surface and cytocompatibility. *Biomaterials*, 27(23), pp.4204–4211. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961206002900>.
- Einhorn, T.A. & Gerstenfeld, L.C., 2015. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature reviews. Rheumatology*, 11(1), pp.45–54. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2014.164%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4464690&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Eriksen, E.F., 2010. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*, 11(4), pp.219–227.
- Estrela, C. et al., 2011. Mesenchymal stem cells in the dental tissues: perspectives for tissue regeneration. *Brazilian dental journal*, 22(2), pp.91–98.
- Everts, V. et al., 2002. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17(1), pp.77–90.
- Federal Interagency Forum on Aging-Related Statistics, 2016. Older Americans 2016: Key Indicators of Well-Being. *U.S. Government Printing Office*.
- Feng, X. & Teitelbaum, S.L., 2013. Osteoclasts: New Insights. *Bone Research*, 1(1), pp.11–26. Available at: <http://dx.doi.org/10.4248/BR201301003>.
- Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil, I. et al., 2006. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral*, 11, pp.47–51.
- Ferron, M. et al., 2008. Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), pp.5266–5270.
- Fisher, L.W. & Fedarko, N.S., 2003. Six Genes Expressed in Bones and Teeth Encode the Current Members of the SIBLING Family of Proteins. *Connective Tissue Research*, 44(1), pp.33–40. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03008200390152061>.
- Florencio-silva, R. et al., 2015. Biology of Bone Tissue : Structure , Function , and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, pp.1–17.
- Food and Drug Administration, 2002. nFUSE™ Bone Graft/LT-CAGE™ Lumbar Tapered Fusion Device - P000058. *U.S. Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services, Center for Devices and Radiological Health.*, pp.1–4. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf/P000058a.pdf.

- Fraioli, R. et al., 2015. Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Mimicking bone extracellular matrix : Integrin-binding peptidomimetics enhance osteoblast-like cells adhesion , proliferation , and differentiation on titanium. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 128, pp.191–200. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.12.057>.
- Frame, M.C. et al., 2010. The FERM domain: organizing the structure and function of FAK. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(11), pp.802–814. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm2996>.
- Fraser, J.K. et al., 2006. Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends in biotechnology*, 24(4), pp.150–154.
- Friedenstein, A.J. & Lalykina, K.S., 1972. Thymus cells are inducible to osteogenesis. *European journal of immunology*, 2(6), pp.602–603.
- Fritton, S.P. & Weinbaum, S., 2009. Fluid and Solute Transport in Bone: Flow-Induced Mechanotransduction. *Annual review of fluid mechanics*, 41, pp.347–374.
- Fuentealba, L.C. et al., 2007. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell*, 131(5), pp.980–993.
- Gao, S. et al., 2009. Ubiquitin ligase Nedd4L targets activated Smad2/3 to limit TGF-beta signaling. *Molecular cell*, 36(3), pp.457–468.
- Gautieri, A. et al., 2011. Hierarchical Structure and Nanomechanics of Collagen Microfibrils from the Atomistic Scale Up. *Nano Letters*, 11(2), pp.757–766. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl103943u>.
- Geiger, B. et al., 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(11), pp.793–805. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/35099066>.
- Gelse, K., Pöschl, E. & Aigner, T., 2003. Collagens - Structure, function, and biosynthesis. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 55(12), pp.1531–1546.
- Gerstenfeld, L.C. et al., 2003. Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: the role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18(9), pp.1584–1592.
- Giannoudis, P. V., Dinopoulos, H. & Tsiridis, E., 2005. Bone substitutes: An update. *Injury*, 36(3), pp.S20–S27. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020138305002871>.
- Gibon, E. et al., 2017. Inflammation, ageing, and bone regeneration. *Journal of Orthopaedic Translation*, 10, pp.28–35. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jot.2017.04.002>.
- Gimble, J.M. et al., 2013. Adipose-derived stromal/stem cells: a primer. *Organogenesis*, 9(1), pp.3–10.
- Graham, S.M. et al., 2010. Biological therapy of bone defects: the immunology of bone allo-transplantation. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(6), pp.885–901. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14712598.2010.481669>.
- Granero-Molto, F. et al., 2008. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone and cartilage repair. *Expert opinion on biological therapy*, 8(3), pp.255–268.
- Grayson, W.L. et al., 2015. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nature reviews. Endocrinology*, 11(3), pp.140–150.
- Grayson, W.L., Ma, T. & Bunnell, B., 2004. Human mesenchymal stem cells tissue development in 3D PET matrices. *Biotechnol Prog*, 20(3), pp.905–912. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citati>

- on&list_uids=15176898.
- Griffin, M., Iqbal, S.A. & Bayat, A., 2011. Exploring the application of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 93(4), pp.427–434.
- Gross, J.C. et al., 2012. Active Wnt proteins are secreted on exosomes. *Nature cell biology*, 14(10), pp.1036–1045.
- Grunert, M. et al., 2007. Isolation of a native osteoblast matrix with a specific affinity for BMP2. *Journal of molecular histology*, 38(5), pp.393–404.
- Guicheux, J. et al., 2003. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18(11), pp.2060–2068.
- Gurry, T., Nerenberg, P.S. & Stultz, C.M., 2010. The contribution of interchain salt bridges to triple-helical stability in collagen. *Biophysical journal*, 98(11), pp.2634–2643.
- Haasters, F. et al., 2014. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients reveal reduced migration and invasion upon stimulation with BMP-2 or BMP-7. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 452(1), pp.118–123. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X14014788>.
- Hamidouche, Z. et al., 2010. Crosstalks between integrin alpha 5 and IGF2/IGFBP2 signalling trigger human bone marrow-derived mesenchymal stromal osteogenic differentiation. *BMC Cell Biology*, 11(1), p.44. Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/11/44>.
- Handschel, J. et al., 2008. Induction of osteogenic markers in differentially treated cultures of embryonic stem cells. *Head & face medicine*, 4, p.10.
- Hauschka, P. V & Wians, F.H.J., 1989. Osteocalcin-hydroxyapatite interaction in the extracellular organic matrix of bone. *The Anatomical record*, 224(2), pp.180–188.
- Hayashi, O. et al., 2008. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcified tissue international*, 82(3), pp.238–247.
- Haylock, D.N. & Nilsson, S.K., 2006. Osteopontin: a bridge between bone and blood. *British journal of haematology*, 134(5), pp.467–474.
- He, X., Ma, J. & Jabbari, E., 2008. Effect of Grafting RGD and BMP-2 Protein-Derived Peptides to a Hydrogel Substrate on Osteogenic Differentiation of Marrow Stromal Cells. *Langmuir*, 24(21), pp.12508–12516. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la802447v>.
- He, X., Yang, X. & Jabbari, E., 2012. Combined effect of osteopontin and BMP-2 derived peptides grafted to an adhesive hydrogel on osteogenic and vasculogenic differentiation of marrow stromal cells. *Langmuir*, 28(12), pp.5387–5397.
- Heino, T.J., Hentunen, T.A. & Väänänen, H.K., 2002. Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor- β : Enhancement by estrogen*. *Journal of Cellular Biochemistry*, 85(1), pp.185–197. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jcb.10109>.
- Helbing, T. et al., 2011. BMP activity controlled by BMPER regulates the proinflammatory phenotype of endothelium. *Blood*, 118(18), pp.5040–5049.
- Hench, L.L., 2002. Third-Generation Biomedical Materials. *Science*, 295(5557), pp.1014–1017. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1067404>.
- Hench, L.L. & Thompson, I., 2010. Twenty-first century challenges for biomaterials. *Journal*

- of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 7 Suppl 4, pp.S379-91.
- Hennessy, K.M. et al., 2009. The effect of collagen I mimetic peptides on mesenchymal stem cell adhesion and differentiation, and on bone formation at hydroxyapatite surfaces. *Biomaterials*, 30(10), pp.1898–1909.
- Herpin, A. & Cunningham, C., 2007. Cross-talk between the bone morphogenetic protein pathway and other major signaling pathways results in tightly regulated cell-specific outcomes. *The FEBS journal*, 274(12), pp.2977–2985.
- Hoang, Q.Q. et al., 2003. Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature*, 425(6961), pp.977–980.
- Horton, E.R. et al., 2015. Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nature Cell Biology*, 17(12), pp.1577–1587. Available at: <http://www.nature.com/gate1.inist.fr/ncb/journal/v17/n12/full/ncb3257.html%5Cnhttp://www.nature.com/gate1.inist.fr/ncb/journal/v17/n12/pdf/ncb3257.pdf>.
- Horton, W.A., 1990. The biology of bone growth. *Growth Geneti. Horm.*, 6(2), pp.1–3.
- Humphries, M.J., Symonds, E.J.H. & Mould, A.P., 2003. Mapping functional residues onto integrin crystal structures. *Current opinion in structural biology*, 13(2), pp.236–243.
- Hutmacher, D.W. et al., 2007. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1(4), pp.245–260.
- Huveneers, S. & Danen, E.H.J., 2009. Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of Cell Science*, 122(8), pp.1059–1069. Available at: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.039446>.
- Hynes, R.O., 2002. Integrins : Bidirectional , Allosteric Signaling Machines. *Cell*, 110, pp.673–687.
- Im, G.-I., Shin, Y.-W. & Lee, K.-B., 2005. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*, 13(10), pp.845–853.
- Imamura, T. et al., 1997. Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature*, 389(6651), pp.622–626.
- Inada, M. et al., 1996. Bone morphogenetic protein-12 and -13 inhibit terminal differentiation of myoblasts, but do not induce their differentiation into osteoblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 222(2), pp.317–322.
- Inkson, C.A. et al., 2009. The potential functional interaction of biglycan and WISP-1 in controlling differentiation and proliferation of osteogenic cells. *Cells, tissues, organs*, 189(1–4), pp.153–157.
- Ishisaki, A. et al., 1999. Differential inhibition of Smad6 and Smad7 on bone morphogenetic protein- and activin-mediated growth arrest and apoptosis in B cells. *The Journal of biological chemistry*, 274(19), pp.13637–13642.
- James, A.W., 2013. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica*, pp.1–17. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3874981&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Jukes, J.M. et al., 2008. Potential of embryonic stem cells for in vivo bone regeneration. *Regenerative medicine*, 3(6), pp.783–785.
- Jukes, J.M., van Blitterswijk, C.A. & de Boer, J., 2010. Skeletal tissue engineering using

- embryonic stem cells. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 4(3), pp.165–180.
- Kahle, M. et al., 2010. Embryonic stem cells induce ectopic bone formation in rats. *Bio-medical materials and engineering*, 20(6), pp.371–380.
- Kalamajski, S. & Oldberg, A., 2010. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 29(4), pp.248–253.
- Kang, Q. et al., 2009. A comprehensive analysis of the dual roles of BMPs in regulating adipogenic and osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev*, 18(4), pp.545–559.
- Kang, Q. et al., 2004. Characterization of the distinct orthotopic bone-forming activity of 14 BMPs using recombinant adenovirus-mediated gene delivery. *Gene therapy*, 11(17), pp.1312–1320.
- Kao, W.J. et al., 2001. Fibronectin modulates macrophage adhesion and FBGC formation: the role of RGD, PHSRN, and PRRARV domains. *Journal of biomedical materials research*, 55(1), pp.79–88.
- Karageorgiou, V. & Kaplan, D., 2005. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*, 26(27), pp.5474–5491.
- Karsenty, G. & Oury, F., 2014. Regulation of male fertility by the bone-derived hormone osteocalcin. *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1), pp.521–526.
- Kartsogiannis, V. & Ng, K.W., 2004. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Molecular and cellular endocrinology*, 228(1–2), pp.79–102.
- Katsimbri, P., 2017. The biology of normal bone remodelling. *European Journal of Cancer Care*, 26(6), pp.1–5.
- Kawabata, M., 1998. Signal transduction by bone morphogenetic proteins. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 9(1), pp.49–61. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610197000361>.
- Keller, J. et al., 2014. Calcitonin controls bone formation by inhibiting the release of sphingosine 1-phosphate from osteoclasts. *Nature communications*, 5, p.5215.
- Kisiel, M. et al., 2013. Improving the osteogenic potential of BMP-2 with hyaluronic acid hydrogel modified with integrin-specific fibronectin fragment. *Biomaterials*, 34(3), pp.704–712. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961212011362>.
- Knothe Tate, M.L. et al., 2004. The osteocyte. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(1), pp.1–8. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272503002413>.
- Kokabu, S. et al., 2012. BMP3 suppresses osteoblast differentiation of bone marrow stromal cells via interaction with Acvr2b. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 26(1), pp.87–94.
- Komori, T., 2010a. Regulation of bone development and extracellular matrix protein genes by RUNX2. *Cell and tissue research*, 339(1), pp.189–195.
- Komori, T., 2010b. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Advances in experimental medicine and biology*, 658, pp.43–49.
- Kretlow, J.D. & Mikos, A.G., 2007. Review: Mineralization of Synthetic Polymer Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Tissue Engineering*, 13(5), pp.927–938. Available at: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.2006.0394>.
- Kretzschmar, M. et al., 1999. A mechanism of repression of TGFbeta/ Smad signaling by

- oncogenic Ras. *Genes & development*, 13(7), pp.804–816.
- Kuboki, Y. et al., 1998. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis. *Journal of Biomedical Materials Research*, 39(2), pp.190–199.
- Kumar, I., Fausto, N. & Abbas, A., 2005. *Pathologic Basis of Disease* 7 th., Robbins and Cotran.
- Lai, C.-F. & Cheng, S.-L., 2005. Alphasbeta integrins play an essential role in BMP-2 induction of osteoblast differentiation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20(2), pp.330–340.
- Lal, H. et al., 2009. Integrins and proximal signaling mechanisms in cardiovascular disease. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 14, pp.2307–2334.
- Lauzon, M.-A. et al., 2012. Bone repair: new developments in growth factor delivery systems and their mathematical modeling. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 162(3), pp.502–520.
- Lauzon, M.-A. et al., 2016. Effects of BMP-9 and BMP-2 on the PI3K/Akt Pathway in MC3T3-E1 Preosteoblasts. *Tissue Engineering Part A*, 22(17–18), pp.1075–1085. Available at: <http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/ten.tea.2016.0151>.
- Lauzon, M.-A. et al., 2014. Identification of a growth factor mimicking the synergistic effect of fetal bovine serum on BMP-9 cell response. *Tissue engineering. Part A*, 20(17–18), pp.2524–2535.
- Lavery, K. et al., 2008. BMP-2/4 and BMP-6/7 Differentially Utilize Cell Surface Receptors to Induce Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(30), pp.20948–20958. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M800850200>.
- Lee, J.O. et al., 1995. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure (London, England : 1993)*, 3(12), pp.1333–1340.
- Lee, N.K. et al., 2007. Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton. *Cell*, 130(3), pp.456–469.
- Liu, F. et al., 2007. [Effects of NGX6 on the transcriptional activation of beta-catenin/TCF/LEF in Wnt/beta-catenin signal pathway]. *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences*, 32(6), pp.985–991.
- Liu, Y., Shepherd, E.G. & Nelin, L.D., 2007. MAPK phosphatases — regulating the immune response. *Nature Reviews Immunology*, 7(3), pp.202–212. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2035>.
- Lodish, H. et al., 2014. *Biologie moléculaire de la cellule* 4e ed. De Boeck, ed.,
- De Long, W.G. et al., 2007. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery. A critical analysis. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 89, pp.649–658.
- Low, S.W. et al., 2009. Use of Osteoplug polycaprolactone implants as novel burr-hole covers. *Singapore medical journal*, 50(8), pp.777–780.
- Luther, G. et al., 2011. BMP-9 induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: molecular mechanism and therapeutic potential. *Current gene therapy*, 11, pp.229–240.
- Luu, H.H. et al., 2007. Distinct Roles of Bone Morphogenetic Proteins in Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Journal of orthopaedic Research*, 25(5), pp.665–677.
- Luxenburg, C., Addadi, L. & Geiger, B., 2006. The molecular dynamics of osteoclast adhesions. *European Journal of Cell Biology*, 85(3–4), pp.203–211. Available at:

- <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171933505001950>.
- Ma, Y. et al., 2016. Concentration-Dependent hMSC Differentiation on Orthogonal Concentration Gradients of GRGDS and BMP-2 Peptides. *Biomacromolecules*, 17(4), pp.1486–1495.
- Macias, M.J., Martin-Malpartida, P. & Massague, J., 2015. Structural determinants of Smad function in TGF-beta signaling. *Trends in biochemical sciences*, 40(6), pp.296–308.
- Madl, C.M. et al., 2014. Presentation of BMP-2 mimicking peptides in 3D hydrogels directs cell fate commitment in osteoblasts and mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules*, 15(2), pp.445–455.
- Mahabeleshwar, G.H. et al., 2007. Mechanisms of Integrin Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Cross-Activation in Angiogenesis. *Circulation Research*, 101(6), pp.570–580. Available at: <http://circres.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/CIRCRESAHA.107.155655>.
- Mai, Z. et al., 2013. Single Bout Short Duration Fluid Shear Stress Induces Osteogenic Differentiation of MC3T3-E1 Cells via Integrin β 1 and BMP2 Signaling Cross-Talk X.-M. Shi, ed. *PLoS ONE*, 8(4), p.e61600. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0061600>.
- Manolagas, S.C., 2000. Birth and Death of Bone Cells: Basic Regulatory Mechanisms and Implications for the Pathogenesis and Treatment of Osteoporosis 1. *Endocrine Reviews*, 21(2), pp.115–137. Available at: <http://press.endocrine.org/doi/abs/10.1210/edrv.21.2.0395>.
- Marie, P., 2001. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *médecine/sciences*, 17(12), pp.1252–1259. Available at: <http://www.medecinesciences.org/10.1051/medsci/200117121252>.
- Marieb, E.N. & Hoehn, K., 2015. *Anatomie et physiologie humaines*.
- Marquis, M. et al., 2009. Bone cells-biomaterials interactions. *Frontiers in Bioscience*, 14, pp.1023–1067.
- Marquis, M.-E. et al., 2008. Short-term effects of adhesion peptides on the responses of preosteoblasts to pBMP-9. *Biomaterials*, 29(8), pp.1005–1016. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014296120700871X>.
- Marsell, R. & Einhorn, T.A., 2011. The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), pp.551–555. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031>.
- Martin, R., Burr, D. & Sharkey, N., 1998. Skeletal Tissue Mechanic. *New York: Springer*.
- Martin, T.J. & Sims, N.A., 2005. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends in molecular medicine*, 11(2), pp.76–81.
- Massague, J., 1998. TGF-beta signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 67, pp.753–791.
- Massagué, J., 2012. TGF β signalling in context. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 13(10), pp.616–30. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3434>.
- Massague, J. & Chen, Y.G., 2000. Controlling TGF-beta signaling. *Genes & development*, 14(6), pp.627–644.
- Massague, J., Seoane, J. & Wotton, D., 2005. Smad transcription factors. *Genes & development*, 19(23), pp.2783–2810.
- Matesanz, M.C. et al., 2014. Early in vitro response of macrophages and T lymphocytes to nanocrystalline hydroxyapatites. *Journal of Colloid and Interface Science*, 416, pp.59–66.
- Matsubara, T. et al., 2008. BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast

- differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(43), pp.29119–29125.
- Matsumoto, Y. et al., 2012. Bone morphogenetic protein-3b (BMP-3b) inhibits osteoblast differentiation via Smad2/3 pathway by counteracting Smad1/5/8 signaling. *Molecular and cellular endocrinology*, 350(1), pp.78–86.
- Mazerbourg, S. & Hsueh, A.J.W., 2006. Genomic analyses facilitate identification of receptors and signalling pathways for growth differentiation factor 9 and related orphan bone morphogenetic protein/growth differentiation factor ligands. *Human reproduction update*, 12(4), pp.373–383.
- McKay, W.F., Peckham, S.M. & Badura, J.M., 2007. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE Bone Graft). *International orthopaedics*, 31(6), pp.729–734.
- McPhee, J.S. et al., 2016. Physical activity in older age: perspectives for healthy ageing and frailty. *Biogerontology*, 17(3), pp.567–580.
- Mena, M.-P. et al., 2014. NFAT2 regulates COX-2 expression and modulates the integrin repertoire in endothelial cells at the crossroads of angiogenesis and inflammation. *Experimental Cell Research*, 324(2), pp.124–136. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482714001128>.
- Mese, G., Richard, G. & White, T.W., 2007. Gap junctions: basic structure and function. *The Journal of investigative dermatology*, 127(11), pp.2516–2524.
- Mi, L.-Z. et al., 2015. Structure of bone morphogenetic protein 9 procomplex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(12), pp.3710–3715.
- Millan, J.L., 2013. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization. *Calcified tissue international*, 93(4), pp.299–306.
- Monchau, F. et al., 2002. In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite, β -tricalcium phosphate, calcium carbonate. *Biomolecular Engineering*, 19(2–6), pp.143–152. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389034402000230>.
- Moore, N.M. et al., 2011. Synergistic enhancement of human bone marrow stromal cell proliferation and osteogenic differentiation on BMP-2-derived and RGD peptide concentration gradients. *Acta Biomaterialia*, 7(5), pp.2091–2100. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1742706111000201>.
- Mori, S. et al., 2008. Direct Binding of Integrin α 3 β 1 to FGF1 Plays a Role in FGF1 Signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), pp.18066–18075. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M801213200>.
- Myllylä, R.M. et al., 2014. Bone morphogenetic proteins 4 and 2/7 induce osteogenic differentiation of mouse skin derived fibroblast and dermal papilla cells. *Cell and Tissue Research*, 355(2), pp.463–470.
- Nagae, M. et al., 2012. Crystal structure of α 5 β 1 integrin ectodomain: Atomic details of the fibronectin receptor. *Journal of Cell Biology*, 197(1), pp.131–140.
- Nakase, T. & Yoshikawa, H., 2006. Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 24(6), pp.425–433. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00774-006-0718-8>.
- Nakashima, K. et al., 2002. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), pp.17–29.
- Ni, G.-X., Li, Z. & Zhou, Y.-Z., 2014. The role of small leucine-rich proteoglycans in osteoarthritis pathogenesis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research*

- Society*, 22(7), pp.896–903.
- zur Nieden, N.I., 2011. Embryonic stem cells for osteo-degenerative diseases. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 690, pp.1–30.
- Nilsson, S.K., Johnston, H.M. & Coverdale, J., 2001. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*, 97(8), pp.2293–2299. Available at: <http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3293/list.htm>.
- Onichtchouk, D. et al., 1999. Silencing of TGF-beta signalling by the pseudoreceptor BAMBI. *Nature*, 401(6752), pp.480–485.
- Oonishi, H. et al., 1999. Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. *Journal of Biomedical Materials Research*, 44(1), pp.31–43.
- Orimo, H., 2010. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku zasshi*, 77(1), pp.4–12.
- Ory, S. et al., 2008. Rho GTPases in osteoclasts: orchestrators of podosome arrangement. *European journal of cell biology*, 87(8–9), pp.469–477.
- Ostéoporose Canada, Qu'est-ce que l'ostéoporose? *Ostéoporose Canada*. Available at: <http://www.osteoporosecanada.ca/osteoporose-et-vous/quest-ce-que-losteoporose/>.
- Oury, F. et al., 2013. Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *The Journal of clinical investigation*, 123(6), pp.2421–2433.
- Ozaki, A. et al., 2000. Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *Journal of Orthopaedic Science*, 5(1), pp.64–70. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0949265815335399>.
- Park, J.E.S. et al., 2012. BMP-9 induced endothelial cell tubule formation and inhibition of migration involves Smad1 driven endothelin-1 production. *PloS one*, 7(1), p.e30075.
- Patel, P.R. et al., 2012. Synthesis and Cell Adhesive Properties of Linear and Cyclic RGD Functionalized Polynorbornene Thin Films. *Biomacromolecules*, 13(8), pp.2546–2553. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm300795y>.
- Patterson-Buckendahl, P. et al., 2012. Decreased sensory responses in osteocalcin null mutant mice imply neuropeptide function. *Cellular and molecular neurobiology*, 32(5), pp.879–889.
- Peichl, P. et al., 2011. Parathyroid hormone 1-84 accelerates fracture-healing in pubic bones of elderly osteoporotic women. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 93(17), pp.1583–1587.
- Piekarski, K. & Munro, M., 1977. Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones. *Nature*, 269(5623), pp.80–82.
- Pierschbacher, M.D. & Ruoslahti, E., 1987. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science (New York, N.Y.)*, 238(4826), pp.491–497.
- Poynton, A.R. & Lane, J.M., 2002. Safety profile for the clinical use of bone morphogenetic proteins in the spine. *Spine*, 27(16 Suppl 1), pp.S40-8.
- Price, P.A. et al., 1976. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(5), pp.1447–1451.
- Prunet-Marcassus, B. et al., 2006. From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences. *Experimental cell research*, 312(6), pp.727–736.
- Pryor, L. et al., 2009. Review of Bone Substitutes. *Craniofacial Trauma and Reconstruction*, 2(3), pp.151–160. Available at: <http://www.thieme->

- connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0029-1224777.
- Public Health Agency of Canada, 2014. The chief public health officer's report on the state of public health in Canada, 2014: Public health in the future. *Public Health Agency of Canada*.
- Raggatt, L.J. & Partridge, N.C., 2010. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *The Journal of biological chemistry*, 285(33), pp.25103–25108.
- Rahman, M.S. et al., 2015. TGF-beta/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone research*, 3, p.15005.
- Rammelt, S., 2014. An Update on the Treatment of Calcaneal Fractures. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 28(10), pp.549–550. Available at: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00005131-201410000-00001>.
- Rasi Ghaemi, S. et al., 2016. Synergistic influence of collagen i and BMP 2 drives osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells: A cell microarray analysis. *Acta Biomaterialia*, 34, pp.41–52. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.027>.
- Ratner, B. et al., 1996. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. *Academic, New York*.
- Ratner, B.D. & Bryant, S.J., 2004. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annual review of biomedical engineering*, 6, pp.41–75.
- Reyes, C.D. et al., 2007. Biomolecular surface coating to enhance orthopaedic tissue healing and integration. *Biomaterials*, 28(21), pp.3228–3235.
- Reyes, C.D. & García, A.J., 2004. $\alpha 2 \beta 1$ integrin-specific collagen-mimetic surfaces supporting osteoblastic differentiation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 69A(4), pp.591–600. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.a.30034>.
- Rezania, A. & Healy, K.E., 2000. The effect of peptide surface density on mineralization of a matrix deposited by osteogenic cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 52(4), pp.595–600.
- Ritter, N.M., Farach-Carson, M.C. & Butler, W.T., 1992. Evidence for the formation of a complex between osteopontin and osteocalcin. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 7(8), pp.877–885.
- Rivera, J.C. et al., 2013. Beyond osteogenesis: An in vitro comparison of the potentials of six bone morphogenetic proteins. *Frontiers in Pharmacology*, 4 OCT(October), pp.1–7.
- Robling, A.G., Castillo, A.B. & Turner, C.H., 2006. Biomechanical and Molecular Regulation of Bone Remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*, 8(1), pp.455–498. Available at: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.bioeng.8.061505.095721>.
- Rodan, S.B. & Rodan, G.A., 1997. Integrin function in osteoclasts. *The Journal of endocrinology*, 154 Suppl, pp.S47-56.
- Rosen, V., 2006. BMP and BMP inhibitors in bone. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068, pp.19–25.
- Ruoslahti, E. & Reed, J.C., 1994. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell*, 77(4), pp.477–478.
- Ryoo, H.-M., Lee, M.-H. & Kim, Y.-J., 2006. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*, 366(1), pp.51–57.
- Saito, A. et al., 2003. Activation of osteo-progenitor cells by a novel synthetic peptide derived from the bone morphogenetic protein-2 knuckle epitope. *Biochimica et biophysica acta*,

- 1651(1–2), pp.60–67.
- Saito, A. et al., 2004. Prolonged ectopic calcification induced by BMP-2 – derived synthetic peptide. *Journal of Biomedical Materials Research*, 70(1), pp.115–121.
- Salazar, V.S., Gamer, L.W. & Rosen, V., 2016. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. *Nature reviews. Endocrinology*, 12(4), pp.203–221.
- Salbach, J. et al., 2012. Regenerative potential of glycosaminoglycans for skin and bone. *Journal of Molecular Medicine*, 90(6), pp.625–635.
- Sapkota, G. et al., 2007. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Molecular cell*, 25(3), pp.441–454.
- Sathiyakumar, V. et al., 2014. Patterns of Costs and Spending Among Orthopedics Surgeons Access the United States: A National Survey. *The American Journal of Orthopedics*, 43(January), pp.137–140.
- Savarino, L. et al., 2007. The performance of poly-epsilon-caprolactone scaffolds in a rabbit femur model with and without autologous stromal cells and BMP4. *Biomaterials*, 28(20), pp.3101–3109.
- Schachtner, H. et al., 2013. Podosomes in adhesion, migration, mechanosensing and matrix remodeling. *Cytoskeleton*, 70(10), pp.572–589. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/cm.21119>.
- Schaefer, L. & Iozzo, R. V., 2008. Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *The Journal of biological chemistry*, 283(31), pp.21305–21309.
- Schaller, M.D. & Parsons, J.T., 1994. Focal adhesion kinase and associated proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 6, pp.705–710.
- Schantz, J.-T. et al., 2006. Cranioplasty after trephination using a novel biodegradable burr hole cover: technical case report. *Neurosurgery*, 58(1 Suppl), p.ONS-E176; discussion ONS-E176.
- Schmidmaier, G. et al., 2008. Carrier systems and application of growth factors in orthopaedics. *Injury*, 39 Suppl 2, pp.S37-43.
- Schwab, E.H. et al., 2013. Distinct effects of RGD-glycoproteins on Integrin-mediated adhesion and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *International journal of medical sciences*, 10(13), pp.1846–1859.
- Senta, H. et al., 2009. Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: biomedical applications and limitations. *Cytokine & growth factor reviews*, 20(3), pp.213–222.
- Seong, J.M. et al., 2010. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomedical materials (Bristol, England)*, 5(6), p.62001.
- Servier Medical Art, No Title. Available at: <http://www.servier.fr/servier-medical-art>.
- Shang, Q. et al., 2001. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *The Journal of craniofacial surgery*, 12(6), pp.585–586.
- Shea, C.M. et al., 2003. BMP Treatment of C3H10T1/2 Mesenchymal Stem Cells Induces Both Chondrogenesis and Osteogenesis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 90(6), pp.1112–1127.
- Shekaran, A., García, J.R., et al., 2014. Biomaterials Bone regeneration using an alpha 2 beta 1 integrin-specific hydrogel as a BMP-2 delivery vehicle. *Biomaterials*, 35(21), pp.5453–5461. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.03.055>.
- Shekaran, A., Garcia, J.R., et al., 2014. Bone regeneration using an alpha 2 beta 1 integrin-specific hydrogel as a BMP-2 delivery vehicle. *Biomaterials*, 35(21), pp.5453–5461.

- Shekaran, A. & Garcia, A.J., 2011. Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 96(1), pp.261–272.
- Shen, B., Bhargav, D., et al., 2009. BMP-13 emerges as a potential inhibitor of bone formation. *International journal of biological sciences*, 5(2), pp.192–200.
- Shen, B., Wei, A., et al., 2009. BMP-2 Enhances TGF- β 3–Mediated Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Alginate Bead Culture. *Tissue Engineering Part A*, 15(6), pp.1311–1320. Available at: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ten.tea.2008.0132>.
- Shim, J.-H. et al., 2009. TAK1 is an essential regulator of BMP signalling in cartilage. *The EMBO Journal*, 28(14), pp.2028–2041. Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1038/emboj.2009.162>.
- Sieber, C. et al., 2009. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(5–6), pp.343–355.
- Song, Y. et al., 2014. Surface functionalization of nanoporous alumina with bone morphogenetic protein 2 for inducing osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Materials Science and Engineering: C*, 37, pp.120–126. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493114000058>.
- Souchelnytskyi, S. et al., 1998. Physical and functional interaction of murine and Xenopus Smad7 with bone morphogenetic protein receptors and transforming growth factor-beta receptors. *The Journal of biological chemistry*, 273(39), pp.25364–25370.
- Speirs, A.D. et al., 1999. Biomechanical properties of sterilized human auditory ossicles. *Journal of Biomechanics*, 32(5), pp.485–491.
- Sreekumar, V. et al., 2017. BMP9 a possible alternative drug for the recently withdrawn BMP7? New perspectives for (re-)implementation by personalized medicine. *Archives of Toxicology*, 91(3), pp.1353–1366.
- Staines, K.A., MacRae, V.E. & Farquharson, C., 2012. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *Journal of Endocrinology*, 214(3), pp.241–255. Available at: <http://joe.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1530/JOE-12-0143>.
- Stupack, D.G. et al., 2001. Apoptosis of adherent cells by recruitment of caspase-8 to unligated integrins. *The Journal of Cell Biology*, 155(3), pp.459–470. Available at: <http://www.jcb.org/lookup/doi/10.1083/jcb.200106070>.
- Su, J.-L. et al., 2010. CYR61 regulates BMP-2-dependent osteoblast differentiation through the α _v β 3 integrin/integrin-linked kinase/ERK pathway. *The Journal of biological chemistry*, 285(41), pp.31325–31336.
- Sun, J. et al., 2015. Role of bone morphogenetic protein-2 in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Molecular Medicine Reports*, 12(3), pp.4230–4237.
- Suva, M.L., Riggi, N. & Bernstein, B.E., 2013. Epigenetic reprogramming in cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6127), pp.1567–1570.
- Takahashi, K. et al., 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5), pp.861–872.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), pp.663–676.
- Tang, N. et al., 2009. BMP-9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitors requires functional canonical Wnt/ β -catenin signalling. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(8b), pp.2448–2464. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1582-4934.2008.00569.x>.

- Tian, H. et al., 2012. Endoglin mediates fibronectin/ $\alpha 5 \beta 1$ integrin and TGF- β pathway crosstalk in endothelial cells. *The EMBO journal*, 31(19), pp.3885–900. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3463850&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Toppets, V. et al., 2004. Morphologie, croissance et remaniement du tissu osseux. *Annales de Medecine Veterinaire*, 148(1), pp.1–13.
- Tremoleda, J.L. et al., 2008. Bone tissue formation from human embryonic stem cells in vivo. *Cloning and stem cells*, 10(1), pp.119–132.
- Tsiridis, E., Upadhyay, N. & Giannoudis, P., 2007. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury*, 38 Suppl 1, pp.S11-25.
- Ullah, I., Subbarao, R.B. & Rho, G.J., 2015. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2), pp.1–18. Available at: <http://bioscirep.org/cgi/doi/10.1042/BSR20150025>.
- Urist, M.R., 1965. Bone: Formation by Autoinduction. *Science*, 150(3698), pp.893–899. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.150.3698.893>.
- Väänänen, K., 2005. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption—rationale for the design of new therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(7), pp.959–971. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X05000761>.
- Valdembri, D. & Serini, G., 2012. Regulation of adhesion site dynamics by integrin traffic. *Current Opinion in Cell Biology*, 24(5), pp.582–591. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2012.08.004>.
- Visser, R. et al., 2012. Basic fibroblast growth factor enhances the osteogenic differentiation induced by bone morphogenetic protein-6 in vitro and in vivo. *Cytokine*, 58(1), pp.27–33.
- Vohra, S. et al., 2008. Comparison of mesenchymal stem cell and osteosarcoma cell adhesion to hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 19(12), pp.3567–3574.
- Wagner, W. et al., 2005. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Experimental Hematology*, 33(11), pp.1402–1416.
- Wang, J. et al., 2011. In vitro osteogenesis of human adipose-derived stem cells by coculture with human umbilical vein endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 412(1), pp.143–149.
- Wang, X., Goh, C.H. & Li, B., 2007. p38 mitogen-activated protein kinase regulates osteoblast differentiation through osterix. *Endocrinology*, 148(4), pp.1629–1637.
- Watabe, H. et al., 2011. Mechanotransduction activates $\alpha 5 \beta 1$ integrin and PI3K/Akt signaling pathways in mandibular osteoblasts. *Experimental Cell Research*, 317(18), pp.2642–2649. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.07.015>.
- White, A.P. et al., 2007. Clinical applications of BMP-7/OP-1 in fractures, nonunions and spinal fusion. *International Orthopaedics*, 31(6), pp.735–741.
- Whitman, M., 1998. Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes & Development*, 12(16), pp.2445–2462. Available at: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.12.16.2445>.
- Wojtowicz, A.M. et al., 2010. Coating of biomaterial scaffolds with the collagen-mimetic peptide GFOGER for bone defect repair. *Biomaterials*, 31(9), pp.2574–2582.
- World Health Organization, 2014. Facts about ageing. *World Health Organization*. Available at: <http://www.who.int/ageing/about/facts/en/>.
- World Health Organization, 2003. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the

- new millennium. *World Health Organization Technical Report*, Series 919.
- Wozney, J.M. et al., 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4885), pp.1528–1534.
- Xiong, J.-P. et al., 2004. A novel adaptation of the integrin PSI domain revealed from its crystal structure. *The Journal of biological chemistry*, 279(39), pp.40252–40254.
- Xiong, J.P. et al., 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5541), pp.339–345.
- Xu, D.-J. et al., 2012. Smads, p38 and ERK1/2 are involved in BMP9-induced osteogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells. *BMB reports*, 45(4), pp.247–252. Available at: <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=E1MBB7&py=2012&vnc=v45n4&sp=247>.
- Yamaguchi, K., 1999. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *The EMBO Journal*, 18(1), pp.179–187. Available at: <http://emboj.embopress.org/cgi/doi/10.1093/emboj/18.1.179>.
- Yamaji, S. et al., 2010. A Novel Fibroblast Growth Factor-1 (FGF1) Mutant that Acts as an FGF Antagonist Y. Cao, ed. *PLoS ONE*, 5(4), p.e10273. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0010273>.
- Yang, X. et al., 2007. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*, 41(6), pp.928–936. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328207005546>.
- Yin, W.-N. et al., 2014. The synergistic effect of a BMP-7 derived peptide and cyclic RGD in regulating differentiation behaviours of mesenchymal stem cells. *J. Mater. Chem. B*, 2(47), pp.8434–8440. Available at: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C4TB01548G>.
- Yoon, S.T. & Boden, S.D., 2002. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies. *Clinical orthopaedics and related research*, 395, pp.33–43. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11937864>.
- Yu, Y.Y. et al., 2010. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone*, 47(1), pp.65–73. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S8756328210005260>.
- Zaidel-Bar, R. et al., 2004. Hierarchical assembly of cell–matrix adhesion complexes. *Biochemical Society Transactions*, 32(3), pp.416–420. Available at: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/bst0320416>.
- Zaidel-Bar, R. & Geiger, B., 2010. The switchable integrin adhesome. *Journal of Cell Science*, 123(9), pp.1385–1388. Available at: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.066183>.
- Zhang, M. et al., 2009. BMP-2 modulates beta-catenin signaling through stimulation of Lrp5 expression and inhibition of beta-TrCP expression in osteoblasts. *Journal of cellular biochemistry*, 108(4), pp.896–905.
- Zhang, P. et al., 2011. RGD-conjugated copolymer incorporated into composite of poly(lactide-co-glycolide) and poly(l-lactide)-grafted nanohydroxyapatite for bone tissue engineering. *Biomacromolecules*, 12(7), pp.2667–2680.
- Zhao, Q. et al., 1997. Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis. *Developmental Dynamics*, 209(4), pp.377–386.
- Zhu, H. et al., 1999. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature*, 400(6745), pp.687–693.
- Zimmerman, L.B., De Jesús-Escobar, J.M. & Harland, R.M., 1996. The Spemann Organizer Signal noggin Binds and Inactivates Bone Morphogenetic Protein 4. *Cell*, 86(4), pp.599–

606. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867400801336>.
- Zoch, M.L., Clemens, T.L. & Riddle, R.C., 2016. New insights into the biology of osteocalcin. *Bone*, 82, pp.42–49.
- Zomer, H.D. et al., 2015. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem cells and cloning: advances and applications*, 8, pp.125–134.
- Zouani, O.F. et al., 2010. Differentiation of pre-osteoblast cells on poly(ethylene terephthalate) grafted with RGD and/or BMPs mimetic peptides. *Biomaterials*, 31(32), pp.8245–8253. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961210008859>.